

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**Internalisation différentielle des récepteurs Cystéinyl
leucotriène 1 et 2 (CysLT1 et CysLT2) : la voie dépendante des
vésicules de clathrine est nécessaire à l'endocytose du CysLT1.**

Par
Karine Audette

Programme d'Études Supérieures en Immunologie
Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé
Université de Sherbrooke

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé en
vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.) en Immunologie

Septembre 2007



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-31347-3

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-31347-3

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	II
LISTE DES ILLUSTRATIONS	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VIII
RÉSUMÉ	XIV
INTRODUCTION.....	1
1.1 HISTORIQUE DES CYSTÉINYL-LEUCOTRIÈNES (CYSLTs).....	1
1.2 SYNTHÈSE DES CYSLTs.....	2
1.3 IMPLICATION DES CYSLTs DANS DIVERSES PATHOLOGIES	4
1.4 L'ASTHME ET LES CYSLTs	5
1.5 EFFETS PATHOPHYSIOLOGIQUES DES CYSLTs DANS L'ASTHME...	6
1.6 LES RÉCEPTEURS DES CYSLTs : GÉNÉRALITÉS	8
1.7 LE RÉCEPTEUR CYSLT1 : GÉNÉRALITÉS	9
1.7.1 Expression du CysLT1 dans les tissus et leucocytes	10
1.7.2 Agonistes et antagonistes du CysLT1.....	11
1.8 ACTIVATION D'UN RCPG (RÉCEPTEUR COUPLÉ AUX PROTÉINES G) PAR SON AGONISTE.....	12
1.9 SIGNALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT1	13
1.10 LE RÉCEPTEUR CYSLT2 : GÉNÉRALITÉS	16
1.10.1 Expression du CysLT2 dans les tissus et leucocytes	16
1.10.2 Agonistes et Antagoniste du CysLT2	17
1.10.3 Signalisation du CysLT2	18
1.11 MÉCANISME D'INACTIVATION DES RCPG	18
1.12 DÉSENSIBILISATION DES RÉCEPTEURS : GÉNÉRALITÉS.....	19

1.12.1 Désensibilisation homologue	20
1.12.1.1 Les kinases des RCPG (GRK).....	20
1.12.1.2 Les arrestines.....	23
1.12.2 Désensibilisation hétérologue.....	26
1.13 VOIES D'INTERNALISATION DES RCPG : GÉNÉRALITÉS	27
1.14 INTERNALISATION DES RCPG PAR LES VÉSICULES DE CLATHRINE	32
1.14.1 Motifs d'internalisation.....	32
1.14.2 La molécule adaptatrice AP-2.....	33
1.14.3 La clathrine.....	35
1.14.4 Autres partenaires d'interaction impliqués dans l'endocytose	36
1.15 RADEAUX LIPIDIQUES ET DES CAVEOLAE : GÉNÉRALITÉS	37
1.15.1 La cavéoline et ses fonctions.....	38
1.15.2 Endocytose par les caveolae	39
1.16 LE DÉTACHEMENT DES VÉSICULES PAR LA DYNAMINE.....	40
1.17 LE DEVENIR DES VÉSICULES ENDOCYTÉES.....	40
1.18 L'ACTINE ET L'ENDOCYTOSE DES RÉCEPTEURS	41
BUT DE L'ÉTUDE.....	43
MATÉRIEL ET MÉTHODES	45
3.1 MATÉRIEL UTILISÉ.....	45
3.2 LIGNÉES STABLES DES RÉCEPTEURS CYSLT1 ET CYSLT2.....	48
3.3 CULTURE CELLULAIRE ET TRANSFECTION	49
3.4 VECTEURS D'EXPRESSION	49
3.5 QUANTIFICATION DES RÉCEPTEURS PRÉSENTS À LA SURFACE CELLULAIRE PAR ELISA.....	49
3.6 ANTAGONISTES, BLOQUEURS DE LA VOIE DÉPENDANTE DES VÉSICULES DE CLATHRINE ET DES RADEAUX LIPIQUES/CAVEOLAE, AGENTS DE DÉPOLYMÉRISATION DE L'ACTINE, INHIBITEURS DE LA SIGNALISATION	51
3.7 ÉTUDE DE L'INTERNALISATION PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX.....	52

3.8 ANALYSE QUANTITATIVE DE L'INTERNALISATION	54
3.9 IMMUNOFLUORESCENCE.....	55
3.10 ESSAIS D'INOSITOL PHOSPHATES.....	58
3.11 ANALYSE STATISTIQUE	60
RÉSULTATS.....	61
4.1 LOCALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT1.....	61
4.2 L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT1 DÉPENDANTE DE L'AGONISTE EST SOUTENUE APRÈS DE LONGS TEMPS DE STIMULATION AVEC LE LIGAND.	63
4.3 RÔLE DES ACIDES AMINÉS 304 À 321 DANS L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT1.....	65
4.4 ÉTUDE DE L'IMPLICATION DES KINASES DES RCPG (GRK) DANS L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT1.....	67
4.5 IMPLICATION DE LA CASÉINE KINASE 1 DANS L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT1.....	70
4.6 IMPORTANCE DES PROTÉINES KINASES C POUR L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT1.....	72
4.7 ÉTUDE DE L'IMPLICATION DES ARRESTINES 2 ET 3 DANS L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT1.....	74
4.8 L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT1 EST DÉPENDANTE DE LA DYNAMINE.	79
4.9 LE RÉCEPTEUR CYSLT1 INTERNALISE VIA LA VOIE DÉPENDANTE DES VÉSICULES DE CLATHRINE.....	82
4.10 L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT1 EST AFFECTÉE PAR DES AGENTS QUI DÉSTABILISENT LES RADEAUX LIPIDIQUES ET LES CAVEOLAE	86
4.11 UN RÉSEAU D'ACTINE INTACT EST NÉCESSAIRE POUR L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT1.....	91

4.12 RÉ-EXPRESSION RAPIDE À LA SURFACE CELLULAIRE DU RÉCEPTEUR CYSLT1 APRÈS LE RETRAIT DE L'AGONISTE	96
4.13 LOCALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT2.....	98
4.14 INTERNALISATION ET EXTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT2	99
4.15 FONCTIONNALITÉ DES RÉCEPTEURS CYSLT2 EXTERNALISÉS	102
4.16 LES RÉCEPTEURS CYSLT1 ET CYSLT2 DÉMONTRENT UN PATRON SIMILAIRE DE PRODUCTION D'INOSITOL PHOSPHATES	105
DISCUSSION.....	107
5.1 L'INTERNALISATION RAPIDE ET SOUTENUE DU RÉCEPTEUR CYSLT1 EST DÉPENDANTE DE LA CASÉINE KINASE 1, DES PKC ET DE LA DYNAMINE MAIS NE SEMBLE PAS IMPLIQUER LES GRK2, 5 ET 6.	107
5.2 INTERNALISATION DÉPENDANTE DES VÉSICULES DE CLATHRINE ET DÉPENDANTE DES RADEAUX LIPIDIQUES DU RÉCEPTEUR CYSLT1.	115
5.3 UN RÉSEAU D'ACTINE INTACT SEMBLE ÊTRE NÉCESSAIRE POUR PERMETTRE L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT1.	122
5.4 LOCALISATION DIFFÉRENTIELLE DES RÉCEPTEURS CYSLT1 ET CYSLT2.	123
PERSPECTIVES	127
CONCLUSIONS	130
REMERCIEMENTS	131
ANNEXE 1.....	133
BIBLIOGRAPHIE.....	134

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Synthèse des cystéinyl-leucotriènes.....	4
Figure 2 : Effets pathophysiologiques des cysLTs dans l'asthme.....	8
Figure 3 : Représentation structurale du récepteur CysLT1	10
Figure 4 : Voies de signalisation activées du récepteur CysLT1	15
Figure 5 : Représentation schématique de la famille des GRK.....	21
Figure 6 : Représentation schématique de la structure de l'arrestine 2 et 3.....	24
Figure 7 : Représentation schématique des voies potentielles d'internalisation des RCPG.	28
Figure 8 : Modèle canonique d'internalisation des RCPG via la voie dépendante des vésicules de clathrine.	31
Figure 9 : Schéma de l'organisation structurale de la protéine adaptatrice AP2.....	34
Figure 10 : Schéma de l'organisation structurale de la clathrine.	35
Figure 11 : Composition biochimique des radeaux lipidiques et.....	38
des caveolae.....	38
Figure 12. Exemple de résultat d'internalisation obtenu par cytométrie de flux.	54
Figure 13. Schéma représentatif de l'internalisation des récepteurs après stimulation avec le ligand.	55
Figure 14. Schéma des étapes à suivre pour l'étude de la fonctionnalité des récepteurs CysLT2 à la surface après stimulation de 4 heures avec le ligand.	59
Figure 15. Localisation du récepteur CysLT1.....	62
Figure 16. L'internalisation du récepteur CysLT1 dépendante de l'agoniste est soutenue après de longs temps de stimulation avec le ligand.	64
Figure 17. Rôle des acides aminés 304 à 321 dans l'internalisation du récepteur CysLT1.....	66

Figure 18. Les GRK 2, 5 et 6 ne semblent pas impliqués dans l'internalisation du récepteur CysLT1.	69
Figure 19. Implication de la caséine kinase 1 dans l'internalisation du récepteur CysLT1.....	71
Figure 20. Importance des protéines kinases C dans l'internalisation du récepteur CysLT1.....	73
Figure 21. Étude de l'implication des arrestines 2 et 3 dans l'internalisation du récepteur CysLT1.	78
Figure 22. L'internalisation du récepteur CysLT1 est dépendante de la dynamine.	81
Figure 23. Le récepteur CysLT1 internalise via la voie dépendante des vésicules de clathrine.	85
Figure 24. L'internalisation du récepteur CysLT1 est affectée par des agents qui déstabilisent les radeaux lipidiques et les caveolae.	90
Figure 25. Un réseau d'actine intact est nécessaire pour l'internalisation du récepteur CysLT1.	95
Figure 26. Ré-expression rapide à la surface cellulaire du récepteur CysLT1 après le retrait de l'agoniste.	97
Figure 27. Localisation du récepteur CysLT2.....	99
Figure 28. Externalisation du récepteur CysLT2.	101
Figure 29. Fonctionnalité des récepteurs CysLT2 externalisés.	104

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide arachidonique
aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AP1	<i>Activating Protein 1</i> (Protéine activatrice 1), Facteur de transcription, complexe de c-Jun/c-Fos
AP-2	<i>Adaptor Protein 1</i> (Protéine adaptatrice 2)
ARF	<i>ADP-ribosylation</i> (facteur ADP-ribosylation)
ARNi	Acide ribonucléique interférant
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Arp2/3	<i>Actin Related Protein</i> (protéines apparentées à l'actine)
Arr2/Arr3	Arrestine 2/arrestine 3 (aussi nommées β arrestine 1/ β arrestine 2, respectivement)
ATP	Adénosine triphosphate
β ARK	<i>β-adrenergic receptor kinase</i>
BayU9773	Acide 6(R)-(4'-carboxyphenyl-thio)-5(S)-hydroxy-7(E),11(Z),14(Z)-éicosatétraénoïque
BisI	Bisindolylmaleimide
BLT1	Récepteur du leucotriène B ₄
BRET	<i>Bioluminescent Resonance Energy Transfer</i>
BSA	Albumine sérique bovine
C-	Carboxy terminal

CaCl ₂	Chlorure de calcium
Cav-1	Cavéoline 1
CCR5	<i>Chemokine CC motif receptor 5</i>
CD	Cluster de différenciation
CK1/CK2	Caséine kinase 1/2
CK1-7	N-(2-aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulfonamide
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute pression
COS	Cellules de rein de singe
CMV	Cytomégalovirus
CXCR4	<i>Chemokine CXC motif receptor 4</i>
cysLTs	Cystéinyl-leucotriènes (LTC ₄ , LTD ₄ et LTE ₄)
CysLT1	Récepteur Cystéinyl-leucotriène 1
CysLT2	Récepteur Cystéinyl-leucotriène 2
DAG	Diacylglycérol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> (milieu de culture Eagle modifié de Dulbecco)
DN	Dominant négatif
DPBS	Tampon phosphate salin de Dulbecco
DRB	5,6-dichloro-1-B-D-ribofuranosylbenzimidazole
EC50	<i>Half-maximal effective concentration</i> (concentration associée à 50 % de l'effet maximum)
EDG	<i>Endothelial differentiation gene</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (essai enzymatique d'immuno-absorbance)
EPS15	<i>Epidermal growth factor receptor Pathway Substrate 15</i>

ERK1/2	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
EtOH	Éthanol
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> (trieur de cellules à fluorescence)
FBS	<i>Fœtal bovine serum</i> (sérum bovin foetal)
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
FLAP	<i>5-lipoxygenase activating protein</i> (protéine activatrice de la 5-lipoxygénase)
Go6976	Indolocarbazole
GF109203X	Bisindolylmaleimide
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
γ -GL	γ -glutamyl leucotriènase
GRK	<i>GPCR kinase</i> (kinase de RCPG)
γ -GT	γ -glutamyl transpeptidase
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
H89	N-[2-(4-bromocinnamyl) aminoethyl]-5-isoquinoline-sulfonamide
HEK	<i>Human embryonic kidney</i> (rein embryonnaire humain)
HEPES	Acide N-2 hydroxyéthyl pipérazine-N'2 éthane sulfonique
5-HPETE	Acide 5-hydroperoxy-eicosatetraénoïque
HRP	Hydroxy-peroxydase
HUVEC	cellules endothéliales ombilicales humaines
IC50	<i>half maximal inhibitory concentration</i> (concentration nécessaire pour diminuer de moitié la réponse)

Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
Int407	Lignée cellulaire épithéliale intestinale humaine
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphates
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i> (site d'entrée interne des ribosomes)
LiCl	Chlorure de lithium
LT	Leucotriène
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> (protéine kinase activée par un mitogène)
MβCD	Méthyl-β-cyclodextrine
MBP	Protéine basique de la myéline
MK	Montelukast
MRP1	Protéine de multirésistance aux médicaments
N-	Amino terminal
NaCl	Chlorure de sodium
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B
NH ₄ Cl	Chlorure d'ammonium
OPD	O-Phenylenediamine
p160 ROCK	<i>Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1</i>
P2Ys	Récepteurs liant les nucléotides
PAF	<i>Platelet-activating factor</i> (facteur d'activation plaquettaire)
PAFR	<i>Platelet-activating factor receptor</i>
PARs	Récepteurs liant les protéases

PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (tampon phosphate salin)
PCA	Acide perchlorique
PFA	Paraformaldéhyde
pH	Potentiel hydrogène
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PI3K	Phosphatidyl inositol 3-kinase
PIP2	Phosphatidyl inositol 4,5-biphosphates
PLC	Phospholipase C
Rab	<i>Ras-like proteins from rat brains</i>
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
Rpm	Révolution par minute
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
SH3	<i>Src homology 3</i>
SRS-A	<i>Slow-reacting substance of anaphylaxis</i>
SRSMS	<i>Slow-reacting smooth muscle-stimulating substance</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TP	Température pièce
TP β	Isoforme β du récepteur du thromboxane A ₂
TRICT	Tetramethylrhodamine isothiocyanate
UDP	Uridine Diphosphate
U937	<i>Human leukemic monocyte lymphoma cell line</i> (lignée cellulaire tumorale monocyttaire humaine)

Y	Tyrosine
293LT1/293LT2	Lignée cellulaire HEK293 exprimant de façon stable le récepteur CysLT1 ou CysLT2
5-LO	5-lipoxygénase

RÉSUMÉ

Internalisation différentielle des récepteurs Cystéinyl leucotriène 1 et 2 (CysLT1 et CysLT2) : la voie dépendante des vésicules de clathrine est nécessaire à l'endocytose du CysLT1.

Par
Karine Audette

Programme d'Études Supérieures en Immunologie
Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke
Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.) en Immunologie

Les récepteurs cystéinyl-leucotriène 1 et 2 font partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ces deux récepteurs partagent une homologie de séquence de 38%, cette homologie étant particulièrement faible dans la région C-terminale. Tout d'abord, nous avons étudié la localisation et l'internalisation des deux récepteurs chez des lignées cellulaires HEK293 exprimant de façon stable l'un ou l'autre des deux récepteurs. Le récepteur CysLT1, localisé principalement au niveau de la membrane plasmique, s'internalise fortement (60%) au cours de la première heure de stimulation au LTD₄ (Leucotriène D₄) et s'accumule dans la région péri-nucléaire. L'internalisation reste soutenue même après 4 heures de stimulation et est bloquée par le Montélu kast, un antagoniste spécifique du récepteur CysLT1. Par contre, le récepteur CysLT2 est situé majoritairement à l'intérieur de la cellule et très faiblement à la surface cellulaire à l'état non-stimulé. Une faible internalisation, soit près de 5%, est observée à des temps de stimulation inférieurs à 1 heure. Toutefois, une augmentation de l'expression à la surface des cellules est observée lorsque les cellules sont stimulées pendant plus de 2 heures au LTC₄ (Leucotriène C₄). Ce phénomène d'externalisation étant intrigant, nous avons étudié la fonctionnalité des récepteurs à la surface via des essais de production d'inositol phosphates après 2 et 4 heures de prétraitement au LTC₄. Nous avons obtenu des hausses de 4 fois de la production des inositol phosphates après 2 et 4 heures de prétraitement au LTC₄ comparativement à un ratio de 2 fois lorsque prétraité à l'EtOH.

L'autre partie du projet consistait à mieux définir l'internalisation du récepteur CysLT1 ainsi que les molécules impliquées. Premièrement, nous avons observé que les acides aminés 304 à 321 de la queue C-terminale du CysLT1 étaient cruciaux pour l'internalisation du récepteur. La cotransfection de mutants et dominants négatifs d'arrestines 2 et 3 a suggéré l'indépendance des arrestines pour l'internalisation du récepteur CysLT1. Nous avons aussi montré que les GRK (kinases de RCPG) 2, 5 et 6, la PKA ainsi que la caséine kinase 2 ne semblent pas nécessaires pour l'internalisation du récepteur CysLT1 contrairement aux PKC et à la caséine kinase 1 qui sont importantes dans ce processus. Ensuite, nous avons démontré que la cotransfection d'un dominant négatif de la dynamine 1A (K44A) empêche l'internalisation du récepteur CysLT1. Étant donné que le potentiel de signalisation du récepteur peut dépendre de la voie d'internalisation empruntée, nous avons étudié les voies d'internalisation possibles. Des prétraitements avec le sucrose hyperosmotique et la concanavaline A ont inhibé l'internalisation du CysLT1 respectivement de 90% et 70%, indiquant la participation des vésicules de clathrine. La baisse d'internalisation induite par certains agents désorganisant le cholestérol membranaire a amené certaines évidences de la participation des radeaux lipidiques. De plus, nous avons démontré l'importance d'un réseau d'actine intact dans le processus d'internalisation du récepteur CysLT1 via des agents qui induisent la dépolymérisation de l'actine. Nous avons obtenu des baisses significatives de l'internalisation de 57% et 43% suite à des prétraitements avec respectivement la cytochalasine D et la latrunculine B. Finalement, la réexpression rapide à la surface des récepteurs CysLT1 suite au retrait de l'agoniste suggère un recyclage rapide des récepteurs via les endosomes précoces.

Les résultats de ce mémoire exposent des divergences au niveau de la localisation et de l'internalisation des récepteurs CysLT1 et CysLT2. Nos résultats suggèrent également que l'internalisation du récepteur CysLT1 est dépendante de l'activité de la dynamine et du réseau d'actine et qu'elle s'effectue via les vésicules de clathrine et possiblement via les radeaux lipidiques.

INTRODUCTION

1.1 HISTORIQUE DES CYSTÉINYL-LEUCOTRIÈNES (CYSLTs)

Il y a plus de 60 ans que l'étude des cystéinyl-leucotriènes a débuté par les groupes de Feldberg, Kellaway et Trethewie. Ces scientifiques ont observé qu'une substance était relâchée de préparations isolées de poumon ou de foie de chien suite à une perfusion avec du venin de serpent. Cette substance pouvait induire une contraction lente des intestins de cobaye (Feldberg et al., 1938; Feldberg and Kellaway, 1938). En 1940, les chercheurs Kellaway et Trethewie ont nommé la substance « slow-reacting smooth muscle-stimulating substance (SRSMSS) ». SRSMSS pouvait être relâchée par un autre facteur que le venin de serpent c'est-à-dire suite à une réaction antigène-anticorps. SRSMSS libérée suite à une provocation d'antigène dans les poumons de cobaye produisait une contraction lente, retardée et prolongée du muscle lisse gastrointestinal contrairement à l'histamine (contraction rapide, immédiate et de courte durée) (Kellaway and Trethewie, 1940). En 1953, Brocklehurst a démontré que cette substance était différente de l'histamine puisque les contractions qu'il observait sur les iléons de cobaye n'étaient pas inhibées par un anti-histaminique soit la mépyramine (Brocklehurst, 1953). En 1962, Brocklehurst a renommé cette substance « slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) » étant donné son rôle important dans les réactions d'hypersensibilité (Brocklehurst, 1962). Morris et Bach ont utilisé la chromatographie en phase liquide à haute pression (CLHP) pour séparer les composantes de la SRS-A produite (Bach et al., 1979; Morris et al., 1978). Le groupe de Morris a démontré une triple absorption dans le spectre ultraviolet avec un maximum à 279 nm. Cette donnée a suggéré la présence de 3 liaisons

doubles conjuguées. Ce n'est qu'en 1979, qu'un chercheur suédois, Bengt Samuelsson, a soutenu que le SRS-A serait un mélange des leucotriènes LTC₄, LTD₄ et LTE₄ (Dahlen et al., 1980; Murphy et al., 1979).

1.2 SYNTHÈSE DES CYSLTs

Les leucotriènes font partis d'une large famille de molécules connue sous le nom d'éicosanoïdes. Le mot « éicosa » provient du grec et signifie 20, référant au fait qu'ils soient dérivés d'acides gras polyinsaturés de 20 carbones (Corey et al., 1980). Le mot « leucotriène » est relié à sa synthèse chez les leucocytes et à sa structure chimique avec trois liaisons doubles conjuguées (triène) (Samuelsson, 1983). Les leucotriènes sont dérivés de l'acide arachidonique (AA) et sont produit par la voie de la 5-lipoxygénase (5-LO) (voir résumé de la synthèse à la Figure 1). Les prostaglandines et le thromboxane proviennent également de l'acide arachidonique mais sont formés via la voie des cyclooxygénases (Smith, 1992).

La première étape de la formation des leucotriènes consiste en la relâche de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires par les phospholipases A2 (Clark et al., 1995; Samuelsson et al., 1987). La 5-lipoxygénase (5-LO) transloque du cytosol ou du noyau vers l'enveloppe nucléaire (Brock et al., 1995) où elle est activée par la protéine FLAP (5-lipoxygenase activating protein) (Dixon et al., 1990). La 5-LO amène donc la formation de l'acide 5-hydroperoxy-eicosatetraenoïque (5-HPETE) et subséquemment d'un intermédiaire instable LTA₄ (Borgeat et al., 1976; Henderson, 1994). Chez les neutrophiles, LTA₄ (intermédiaire instable) est préférentiellement

hydrolysé en leucotriène dihydroxy, LTB₄, par la LTA₄ hydrolase (Evans et al., 1985), tandis que les éosinophiles, basophiles, mastocytes et macrophages forment de façon préférentielle du LTC₄ via la conjugaison du LTA₄ à une glutathione par la LTC₄ synthase (Lam et al., 1994). Le gène encodant pour la LTC₄ synthase se situe sur le chromosome 5q, une région associée avec l'atopie et l'asthme (Bigby et al., 1996). D'autres cellules telles que les cellules endothéliales et épithéliales, les lymphocytes ainsi que les plaquettes peuvent également transformer les LTA₄ en cystéinyl-leucotriènes. Le LTC₄ est exporté à la surface cellulaire (Lam et al., 1989) via une étape requérant la MRP1 (protéine de multirésistance aux médicaments) (Leier et al., 1994). Le LTC₄ est converti extracellulairement en LTD₄ par la gamma-glutamyl transpeptidase (γ-GT) (Anderson et al., 1982) ou par une enzyme spécifique plus fonctionnelle, la γ-glutamyl leucotriénase (γ-GL) (Carter et al., 1998). Des essais in-vitro avec du sang de sujets normaux ont chiffré les temps de demi-vie du LTC₄ et LTD₄ à respectivement 11,5 minutes et 5 minutes (Zakrzewski et al., 1989). Le LTD₄ est ensuite métabolisé en LTE₄ par une dipeptidase (Lee et al., 1983) et le LTE₄ est excrété dans l'urine sans autre modification chimique (Samuelsson et al., 1987). Le LTC₄, LTD₄ et LTE₄ sont les cystéinyl-leucotriènes. Le 4 en indice réfère au nombre de liens doubles présents dans la molécule.

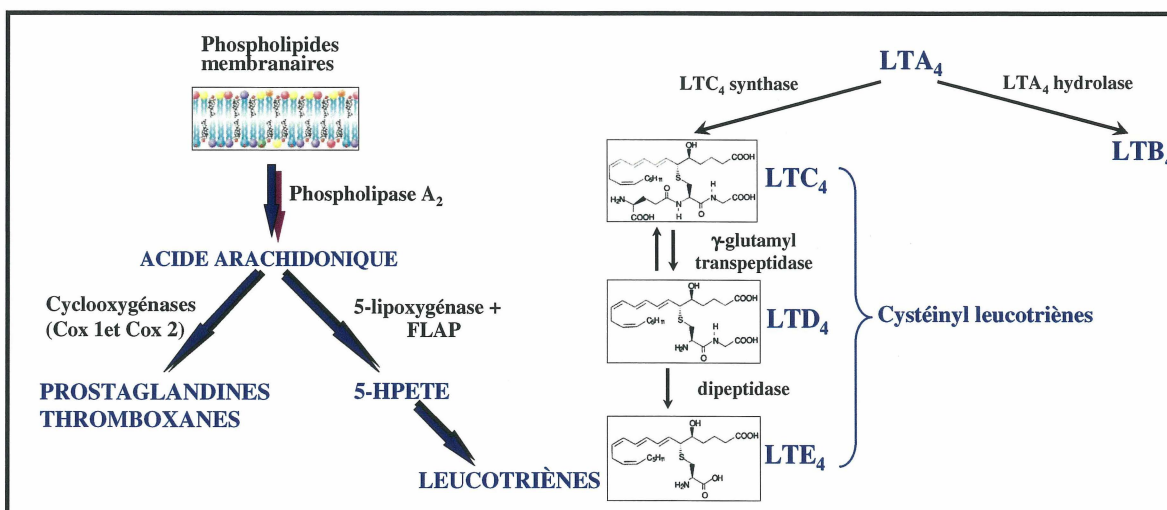


Figure 1 : Synthèse des cystéinyl-leucotriènes

1.3 IMPLICATION DES CYSLTs DANS DIVERSES PATHOLOGIES

Le niveau de LTE₄ présent dans l'urine est utilisé comme marqueur de la production totale des cysLTs dans le corps (Westcott et al., 1998). Plusieurs études ont démontré une hausse d'excrétion de LTE₄ dans l'urine de patients atteints d'asthme (Christie et al., 1991; Green et al., 2004; Lee, 2004; Manning et al., 1990; O'Sullivan et al., 1998a; O'Sullivan et al., 1998b; Sampson et al., 1995; Smith et al., 1991; Smith et al., 1992) et de rhinite allergique (Higashi et al., 2003; Taylor et al., 1989). Cette élévation a été également observée chez certains troubles cardiovasculaires (Folco et al., 2000) tels que suite à des épisodes d'angine instable et d'infarctus aigu du myocarde (Carry et al., 1992), dans les maladies de l'artère coronaire et après un pontage aorto-coronarien (Allen et al., 1993). L'augmentation urinaire de LTE₄ a été aussi remarquée dans certaines maladies gastro-intestinales telles que la maladie de Crohn (Kim et al., 1995), des maladies cutanées telles que l'eczéma atopique et la dermatite (Hishinuma et al., 2001), chez certaines pathologies immunitaires telles que l'arthrite rhumatoïde (Nakamura et al.,

2001) ainsi que dans certains cancers tels que les astrocytomes malins (Simmet et al., 1990).

1.4 L'ASTHME ET LES CYSLTs

Dans le monde entier, il est estimé que plus de 300 millions de personnes sont atteintes d'asthme et ce chiffre devrait s'élever à 400 millions en 2025. L'asthme serait responsable de 0,4% de toutes les causes de décès confondues (Lancet, 2006). L'asthme est une condition inflammatoire chronique des voies respiratoires (Walsh, 2006). Plusieurs facteurs peuvent déclencher l'asthme tel que les allergènes dans l'environnement, l'exercice, les menstruations et même certains médicaments comme l'aspirine. Chez la majorité des enfants, l'asthme a un caractère phénotypique plutôt allergique (Tang et al., 2003). Plusieurs cellules sont impliquées dans la pathophysiologie de l'asthme, en particulier les mastocytes, les éosinophiles et les lymphocytes T (de Pater-Huijsen et al., 1997). Les mastocytes sont impliqués au niveau de la réponse allergique immédiate tandis que les lymphocytes vont jouer un rôle dans l'initiation de l'atopie ainsi que dans les réponses plus tardives et l'inflammation chronique. Une fois l'allergène lié à l'IgE sur la cellule, les mastocytes relâchent des médiateurs qui vont induire la réponse inflammatoire (Galli et al., 2005; Yamaguchi et al., 1997). Ces médiateurs incluent l'histamine, les facteurs chimiotactiques, le PAF (facteur activateur des plaquettes) et les métabolites de l'acide arachidonique, notamment les prostaglandines, le thromboxane et les leucotriènes (Christie and Henderson, 2002).

Précédemment, il a été mentionné que les niveaux d'excrétion urinaire de LTE_4 sont plus élevés chez les patients atteints d'asthme que chez les sujets normaux. La hausse urinaire de LTE_4 reflète l'augmentation de la production totale de cysLTs dans le corps. Cette augmentation chez les patients atteints d'asthme corrèle également avec la hausse de LTB_4 plasmatique (Sampson et al., 1995; Shindo et al., 1993) et l'élévation des cysLTs dans le liquide du lavage broncho-alvéolaire (Lam et al., 1988; Wenzel et al., 1990) ainsi que dans les expectorations (Brightling et al., 2000; Macfarlane et al., 2000; Pavord et al., 1999) des patients avec asthme. D'autres observations appuient également la hausse totale des cysLTs. Il a été démontré que les éosinophiles de patients avec asthme bronchique synthétisent de 5 à 10 fois plus de LTC_4 que les éosinophiles de sujets normaux (Bruijnzeel et al., 1993). Par ailleurs, le groupe de Shida a montré une hausse de l'activité de la 5-lipoxygénase chez les leucocytes polymorphonucléaires de patients asthmatiques (Mita et al., 1985). De plus, dans le cas de l'asthme induit par l'aspirine, une surexpression de la LTC_4 synthase dans des biopsies de bronches des patients est observée (Cowburn et al., 1998). La 5-lipoxygénase ainsi que la LTC_4 synthase sont des molécules clés dans la synthèse des leucotriènes et peuvent donc influencer la production totale de leucotriènes.

1.5 EFFETS PATHOPHYSIOLOGIQUES DES CYSLTs DANS L'ASTHME

Les cysLTs sont de puissants bronchoconstricteurs, 100 à 1000 fois plus puissants que l'histamine, impliqués dans la pathogénèse de l'asthme (Barnes et al., 1984). Ils sont notamment importants dans la modulation de l'inflammation et le remodelage des voies aériennes (Davies et al., 2003; Holgate et al., 2003). Ces molécules sont impliquées dans

plusieurs aspects de la pathophysiologie de l'asthme (voir résumé des effets en Figure 2). Les cyLTs induisent la contraction et la prolifération du muscle lisse (Dahlen et al., 1980; Espinosa et al., 2003; Panettieri et al., 1998). Ils augmentent la sécrétion de mucus (Bisgaard et al., 1986; Johnson and McNee, 1983; Marom et al., 1982), perturbent l'activité mucociliaire (Bisgaard and Pedersen, 1987) et ainsi diminuent le transport du mucus (Ahmed et al., 1981; Bisgaard and Pedersen, 1987). Les cysLTs augmentent la perméabilité vasculaire (Bisgaard et al., 1985b), permettant l'extravasation et le recrutement de cellules inflammatoires contribuant ainsi à l'œdème caractéristique de l'asthme (Arakawa et al., 1993; Hua et al., 1985). Ils augmentent également la relâche de tachykinines telle la substance P (Bloomquist and Kream, 1990). Les tachykinines relâchées participeraient à la contraction des muscles lisses et à l'extravasation plasmatique contribuant à l'inflammation (Hay et al., 1995). Les cysLTs, particulièrement LTD₄ et LTE₄, induisent également le recrutement des éosinophiles, étant reconnus comme le type cellulaire prédominant dans l'inflammation liée à l'asthme. Des études ont démontré que près de 50% des asthmes tant juvéniles qu'adultes sont de nature éosinophilique (Busse and Sedgwick, 1992; Gibson et al., 2001; Laitinen et al., 1993; Ohshima et al., 2002; Spada et al., 1994; Underwood et al., 1996). Les granules de l'éosinophile libèrent des médiateurs cytotoxiques (Erjefalt et al., 1999), telle la protéine basique majeure (MBP), qui endommagent l'épithélium cilié respiratoire (Tagari et al., 1992). Finalement, ces molécules augmentent l'hyperréactivité des voies respiratoires (Bisgaard et al., 1985a) et causent l'hypertrophie des muscles lisses (Ebina et al., 1990) chez les sujets aussi bien en santé qu'asthmatiques.

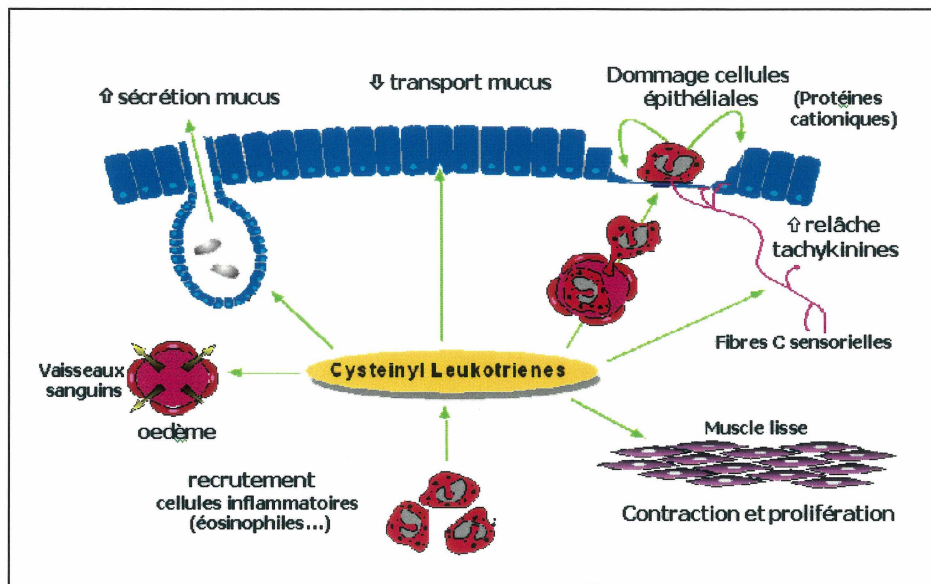


Figure 2 : Effets pathophysiologiques des cysLTs dans l’asthme
Adapté de (Hay et al., 1995)

1.6 LES RÉCEPTEURS DES CYSLTs : GÉNÉRALITÉS

Les cysLTs peuvent lier au moins 2 récepteurs soit les récepteurs cystéinyl-leucotriènes 1 et 2 (CysLT1 et CysLT2). Ces deux récepteurs sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) (Metters and Zamboni, 1993). Ils appartiennent au groupe δ des récepteurs purines et font partis de la famille rhodopsine (Fredriksson et al., 2003). Ce groupe de récepteurs phylogénétiquement apparentés comprend beaucoup de récepteurs dits orphelins, les récepteurs liant les nucléotides (P2Ys), les protéases (PARs) et le PAF (PAFR) (Fredriksson et al., 2003; Kroeze et al., 2003). Un fait intéressant à noter est que contrairement aux récepteurs neuropeptides ou monoamines, les récepteurs du groupe purine n’ont pas d’homologues précis chez les invertébrés, ce qui suggère une apparition relativement récente de ces récepteurs (Adams et al., 2000; Consortium, 1998).

1.7 LE RÉCEPTEUR CYSLT1 : GÉNÉRALITÉS

Dans les années 1983-84, plusieurs groupes de recherche ont détecté une liaison du LTC₄ et/ou du LTD₄ aux membranes de poumon de cobaye, de rat ou de fœtus humain par des essais de liaison de radioligands (Bruns et al., 1983; Lewis et al., 1984; Pong et al., 1983). Ces études ont mené à la caractérisation du récepteur du leucotriène D₄ dans les poumons de cobaye et d'humain ainsi que dans les macrophages alvéolaires humains (Lewis et al., 1985; Mong et al., 1984; Opmeer and Hoogsteden, 1984). Toutefois, ce n'est qu'en 1999 que le clonage du récepteur CysLT1 a été accompli par les groupes de Lynch et Sarau (Lynch et al., 1999; Sarau et al., 1999).

Le récepteur CysLT1 encode pour une protéine de 337 acides aminés avec une masse moléculaire calculée de 38 kDa (Lynch et al., 1999). Il possède une homologie de séquence avec les récepteurs P2Y et du PAF de 31%. Toutefois, il a une faible homologie de séquence pour le BLT1 (récepteur du leucotriène B₄) soit 28% d'identité en acides aminés (Lynch et al., 1999). Le gène du récepteur CysLT1 se situe sur le chromosome X (Xq13-21) près d'une région d'intérêt dans l'asthme (Lynch et al., 1999). Il comprend 5 exons et une région promoteur contenant entre autre 2 éléments de réponse consensus STAT6, éléments étant activés lors de la signalisation de l'interleukine-4 (IL-4). Surexprimée dans la pathologie de l'asthme, l'IL-4 est une cytokine pro-inflammatoire de type Th2 qui stimule la production d'immunoglobulines spécifiques (Woszczek et al., 2005). Le récepteur CysLT1 humain possède 4 sites potentiels de N-glycosylation (un en N-terminal, deux dans la 2^{ème} boucle extracellulaire et un dans la 3^{ème} boucle extracellulaire). Plusieurs sites potentiels de phosphorylation par les protéines kinases A

macrophages alvéolaires, des sous-ensembles de monocytes, les cellules CD34+ prégranulocytes ainsi que les lymphocytes B (Figuerola et al., 2001; Lynch et al., 1999).

1.7.2 Agonistes et antagonistes du CysLT1

Les cysLTs, LTC₄, LTD₄ et LTE₄, sont les agonistes du récepteur CysLT1 et ceux-ci possèdent des affinités et puissances distinctes pour le récepteur. Exprimé dans les cellules embryonnaires humaines HEK-293, le récepteur CysLT1 répond aux ligands suivants par une mobilisation calcique selon différents ordres de puissance : LTD₄ (EC₅₀=2.5nM) > LTC₄ (EC₅₀=24nM) > LTE₄ (EC₅₀=240nM) (Lynch et al., 1999; Sarau et al., 1999). L'affinité des cysLTs pour le récepteur CysLT1 a également été étudiée via la compétition des sites de liaison sur des membranes préparées de cellules Cos-7 et voici l'ordre d'affinité obtenu : LTD₄ (IC₅₀=0.9nM) >> LTE₄ (IC₅₀=274nM) = LTC₄ (IC₅₀=360nM) >> LTB₄ (IC₅₀>3000nM) (Lynch et al., 1999). L'affinité du LTD₄ pour le récepteur CysLT1 serait donc 350 fois plus élevée que celle du LTC₄ (Lynch et al., 1999).

Plusieurs antagonistes pour le récepteur CysLT1 ont été développés et investigués lors d'études cliniques. De ceux-ci, 3 antagonistes puissants et sélectifs sont utilisés en clinique pour le traitement de l'asthme : le pranlukast (Onon; SB 205312; Ono-1078) (Obata et al., 1992; Tamaoki et al., 1997), le zafirlukast (ICI 204,219; Accolate) (Krell et al., 1990; Spector et al., 1994) et le montélukast (MK-476; Singulair) (Jones et al., 1995; Reiss et al., 1996; Thomson and Shepherd, 2003). Le montélukast domine sur le marché européen et des États-Unis, tandis que le pranlukast se retrouve majoritairement sur les

marchés asiatiques et japonais (Dahlen, 2006). Aux États-Unis, le montélukast et le zafirlukast ont été approuvés comme médicaments de premier choix dans la thérapie de l'asthme. Toutefois, en Europe, le montélukast fait parti de la 3^{ème} ligne de traitement de l'asthme et est ajouté lorsque le traitement avec les glucocorticoïdes échoue. Il y est également prescrit en prophylaxie chez les patients présentant une bronchoconstriction importante lors d'un exercice (Dahlen, 2006).

1.8 ACTIVATION D'UN RCPG (RÉCEPTEUR COUPLÉ AUX PROTÉINES G) PAR SON AGONISTE

Lorsqu'un ligand (lipide, neurotransmetteur, peptide, hormone, facteur de croissance, molécule odorante) se lie au récepteur, ce dernier subit un changement de conformation qui active et lie les protéines G hétérotrimériques (composées de 3 sous-unités : α GDP, β et γ) (Perez and Karnik, 2005). La plupart des récepteurs se lient aux protéines G via la 3^{ème} boucle intracellulaire et la queue C-terminale. Il se produit alors un échange rapide d'un GDP pour un GTP sur la sous-unité α . Cet échange va résulter en la dissociation du complexe de la protéine G en sous-unités α -GTP et $\beta\gamma$ (Christopoulos and Kenakin, 2002). Il existe 4 familles de sous-unités $G\alpha$ soit $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q/11}$ et $G_{\alpha 12-13}$. Les sous-unités α -GTP et $\beta\gamma$ vont activer à leur tour une série d'effecteurs tels que des enzymes (la phospholipase C ou l'adénylyl cyclase) ou encore des canaux ioniques. L'activité de ces effecteurs activés va moduler la concentration intracellulaire de messagers secondaires tels l'AMPc, l'IP₃, le DAG (Marinissen and Gutkind, 2001). Par exemple, la sous-unité $G_{\alpha s}$ stimule l'adénylyl cyclase et ainsi augmente la production d'AMPc. Ce second messenger va à son tour activer d'autres éléments des voies de

signalisation tels que la protéine kinase A (PKA). À l'inverse, la sous-unité Gas inhibe l'adenylyl cyclase et diminue ainsi la quantité d'AMPc. La sous-unité Gαq agit sur la phospholipase C en la stimulant de façon à produire de l'IP₃ et le diacylglycérol (DAG) à partir de PIP₂. Le DAG active la protéine kinase C (PKC) tandis que l'IP₃ stimule la relâche de calcium à partir des réserves intracellulaires. La sous-unité Gi/o agit sur les canaux potassiques et calciques en stimulant leur ouverture pour modifier la concentration intracellulaire en ions K⁺ et Ca²⁺. Ultimement, ces seconds messagers vont activer des facteurs de transcription au noyau, réguler ainsi l'expression génique et conduire à l'activation de fonctions biologiques clés telles que la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Marinissen and Gutkind, 2001).

1.9 SIGNALISATION DU RÉCEPTEUR CysLT1

Comme il l'a été mentionné précédemment, il existe 4 familles de sous-unités Gα soit Gas, Gai, Gαq/11 et Gα12-13. Or, il n'y a pas encore de consensus sur les protéines G qui sont activées suite à la liaison du LTD₄ au CysLT1. Des études de sensibilité en regard à la toxine de pertussis ont démontré que différentes sous-unités Gα sont activées selon le type cellulaire utilisé et plus particulièrement le niveau d'expression du récepteur (endogène ou surexpression) (Paruchuri and Sjolander, 2003; Sarau et al., 1999). Si le récepteur est exprimé dans un système de surexpression telles les cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur CysLT1, il y a plutôt activation de la sous-unité Gq/11 plutôt que Gi/o, suggéré par le manque d'effet de la toxine de pertussis sur la mobilisation calcique (Sarau et al., 1999). Toutefois, si l'expression du CysLT1 est endogène telle que chez les cellules U937 humaines, la mobilisation calcique est

partiellement bloquée par la toxine de pertussis. Dans ce modèle d'expression du récepteur CysLT1, il y a donc activation de protéines G à la fois sensibles ($G_{\alpha i}$ ou α_o) et insensibles à la toxine de pertussis (Saussy et al., 1989).

La signalisation du récepteur CysLT1 a été étudiée chez la lignée épithéliale intestinale Int407 (un résumé des travaux de Sjölander est présenté à la Figure 4). Il a été démontré que le LTD₄ induit l'activation de la phospholipase C γ 1 (PLC γ) amenant la formation d'inositol 1,4,5-triphosphates (IP₃) et la mobilisation de calcium chez les cellules Int407 (Gronroos et al., 1995). L'activation de PLC γ implique aussi la formation de diacylglycérol (DAG) et par conséquent l'activation des protéines kinases C (PKC). Chez les Int407, les PKC ϵ , α et δ sont activées par le LTD₄, spécifiquement la PKC ϵ participe à la mobilisation calcique (Thodeti et al., 2001). En 2002, le groupe de Sjölander a démontré chez les Int407 que le LTD₄ induisait une réorganisation du cytosquelette ainsi qu'une rapide formation de fibres de stress (Massoumi et al., 2002). Ils ont aussi trouvé que ces effets étaient dirigés par l'activation de Rho et par conséquent de PKC δ (Massoumi et al., 2002). Dans le cas de la formation de fibres de stress, des effecteurs de Rho sont également nécessaires tels que p160ROCK (Takai et al., 2001).

La famille Gai est sensible à la toxine de pertussis. Elle est ADP-ribosylée par celle-ci, ce qui découple la protéine G du récepteur activé (Asano et al., 1985). Le groupe de Sjölander a observé, chez la lignée Int407, que la mobilisation de calcium induite par le LTD₄ ainsi que l'activation de ERK 1/2, sont médiées par la protéine Gai3, protéine sensible à la toxine de pertussis (Nielsen et al., 2005). Toutefois, la formation de fibres de

stress semble être médiée par $G\alpha_{12}$, étant donné que la toxine de pertussis n'a pas d'effet sur sa formation mais qu'un bloqueur de $G\alpha_{12}$ inhibe son apparition (Nielsen et al., 2005).

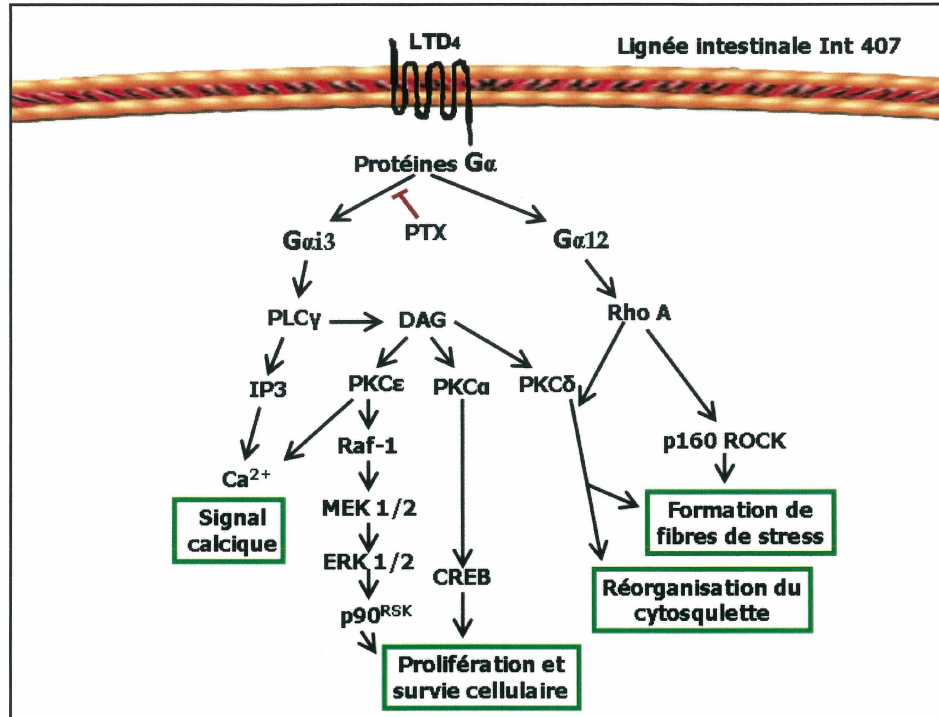


Figure 4 : Voies de signalisation activées du récepteur CysLT1 chez les cellules Int407. Schéma résumé des travaux de Anita Sjölander (Nielsen et al., 2005) (Paruchuri and Sjölander, 2003)

Récemment, il a été démontré dans notre laboratoire que le LTD₄ par son récepteur CysLT1 induit la synthèse et la production de la cytokine IL-8 chez les monocytes et les cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur CysLT1. Cette modulation de l'expression transcriptionnelle de l'IL-8 implique les voies de signalisation NF- κ B et AP1 et donc les facteurs de transcription p50, p65, c-Fos et c-Jun (Thompson et al., 2006).

1.10 LE RÉCEPTEUR CYSLT2 : GÉNÉRALITÉS

La première évidence qu'il existerait un autre type de récepteur CYSLT a été amenée par le groupe de Labat. Ils ont remarqué que les contractions induites par les LTC₄ et LTD₄ dans les muscles lisses de poumon, étaient résistantes à plusieurs antagonistes du CysLT1 (Labat et al., 1992). De là, on a proposé l'existence d'un deuxième sous-type de récepteur CYSLTs, le CysLT2, qui a été cloné en 2000 par les groupes de Heise et Nothacker (Heise et al., 2000; Nothacker et al., 2000). Le récepteur humain CysLT2 encode pour une protéine de 346 acides aminés. Il possède 4 sites potentiels de N-glycosylation tout comme le CysLT1 (trois dans la partie N-terminale et l'autre dans la 2^{ème} boucle extracellulaire) (Heise et al., 2000). Le CysLT2 possède également des sites potentiels de phosphorylation par les protéines kinases A et C, principalement localisés dans la 3^{ème} boucle intracellulaire et la portion C-terminale du récepteur (Heise et al., 2000). Ce récepteur partage une homologie de séquence de 38% avec le récepteur CysLT1 avec une très faible homologie dans l'extrême partie C-terminale (Capra, 2004). Le gène du récepteur CysLT2 se situe sur le chromosome 13 (13q14) près d'une région associée à l'asthme atopique (Cookson, 1999; Kimura et al., 1999).

1.10.1 Expression du CysLT2 dans les tissus et leucocytes

Le récepteur CysLT2 est exprimé dans les leucocytes du sang périphérique, plus fortement chez les éosinophiles (90%), mais est également exprimé tout comme le récepteur CysLT1 chez les monocytes (30%), les macrophages interstitiels ainsi que la rate (Figuroa et al., 2003; Heise et al., 2000). De plus, le récepteur CysLT2 a une localisation exclusive dans le cœur, le cerveau, les glandes surrénales et les ganglions

lymphatiques (Heise et al., 2000). Au niveau du cœur, le CysLT2 se retrouve notamment dans le muscle lisse de l'artère coronaire ainsi que dans les fibres de Purkinje, les myocytes et les fibroblastes des ventricules et des oreillettes (Heise et al., 2000; Takasaki et al., 2000). De plus, il a été démontré que les cellules endothéliales ombilicales humaines (HUVEC) expriment de façon exclusive le récepteur CysLT2 (Sjostrom et al., 2003).

1.10.2 Agonistes et Antagoniste du CysLT2

Un essai aequorin dans des cellules HEK293 transfectées avec le récepteur CysLT2 a permis d'en apprendre davantage sur la puissance des cysLTs pour ce récepteur. Le LTD₄ (EC₅₀ = 104 nM) a une puissance légèrement supérieure au LTC₄ (EC₅₀ = 67 nM) sur le CysLT2 tandis que le LTE₄ est un agoniste partiel du récepteur (Heise et al., 2000). Le récepteur CysLT2 se lie avec une affinité équivalente aux LTD₄ et LTC₄ contrairement au récepteur CysLT1 qui a une affinité beaucoup plus grande pour le LTD₄. Voici l'ordre d'affinité des cysLTs pour le récepteur CysLT2 : LTC₄ = LTD₄ > LTE₄ (Heise et al., 2000; Nothacker et al., 2000).

Le récepteur CysLT2 n'a pas encore été bien caractérisé comparativement au récepteur CysLT1 qui a fait l'objet de nombreuses études tant au niveau pharmacologique que fonctionnel. L'absence d'un antagoniste spécifique pour le récepteur CysLT2 pourrait expliquer cette différence au niveau de la caractérisation de ces deux récepteurs (Peters, 2003). Seul le BayU9773 est un antagoniste du récepteur CysLT2 mais il agit également

comme un antagoniste du CysLT1 et même comme un agoniste partiel du CysLT2 (Dupre et al., 2004; Nothacker et al., 2000; Tudhope et al., 1994).

1.10.3 Signalisation du CysLT2

Il y a donc très peu d'information disponible pour l'instant sur la signalisation du récepteur CysLT2 endogène dû à l'absence d'antagoniste spécifique. Un essai fonctionnel chez les oocytes *Xenopus* a démontré que le récepteur CysLT2 ne semble pas se coupler à une protéine G sensible à la toxine de pertussis (Heise et al., 2000). Chez les HUVEC, la mobilisation calcique produite par le CysLT2 est aussi insensible à la toxine de pertussis (Capra et al., 2006). Toutefois, le groupe de Mellor a montré, chez des mastocytes humains, que l'activation du CysLT2 passerait par une protéine G sensible à la toxine de pertussis soit Gi/Go. La stimulation du CysLT2 amène la sécrétion d'IL-8 via l'activation de la MAPK p38 qui est complètement inhibée par la toxine de pertussis (Mellor et al., 2003).

1.11 MÉCANISME D'INACTIVATION DES RCPG

La suppression de l'agoniste du milieu extracellulaire, la désensibilisation via la phosphorylation, l'endocytose et la dégradation des RCPG sont des mécanismes utilisés par la cellule pour inactiver les récepteurs et réguler négativement les réponses cellulaires.

Le premier mécanisme implique une baisse de la concentration de ligand disponible pour le récepteur. Le ligand peut être dégradé directement dans l'espace extracellulaire par des enzymes membranaires ou sécrétés ou encore être recapturé dans la cellule et ainsi être dégradé par des enzymes intracellulaires (Bohm et al., 1997). Les autres mécanismes d'inactivation des RCPG seront décrits en détails un peu plus loin.

1.12 DÉSENSIBILISATION DES RÉCEPTEURS : GÉNÉRALITÉS

La désensibilisation survient pour atténuer l'activité du récepteur lors d'une stimulation répétée. C'est un phénomène de régulation cellulaire important qui permet de contrôler la durée de l'activation cellulaire. Il existe au niveau moléculaire deux types de désensibilisation impliquant une phosphorylation des récepteurs soit la désensibilisation hétérologue et homologue (Tobin, 1997). Une autre forme de désensibilisation nommée la « *down regulation* » des récepteurs est définie par la déplétion des récepteurs due à l'altération des taux de synthèse et de dégradation des récepteurs. Elle survient lors de stimulations répétées et/ou prolongées avec l'agoniste et empêche ainsi l'apparition d'effets toxiques (Scott et al., 2004). Du côté clinique, la désensibilisation est à surveiller lors de la tolérance aux médicaments où l'on assiste à une perte progressive du bénéfice clinique des médicaments. La résistance aux bronchodilatateurs β -adrénergiques ou aux analgésiques opioïdes en sont deux exemples (Scott et al., 2004).

1.12.1 Désensibilisation homologue

Le modèle canonique de désensibilisation homologue d'un RCPG dépend strictement de la présence de l'agoniste et implique généralement les kinases couplées aux protéines G (GRK) et les arrestines (Krupnick and Benovic, 1998). En premier lieu, il y a phosphorylation rapide (secondes) du récepteur par les GRK. Cette dernière étape augmente l'affinité du récepteur pour les arrestines et peut altérer directement le couplage entre les RCPG et les protéines G (Krupnick and Benovic, 1998). Les arrestines se lient au récepteur dans la région de la troisième boucle intra-cytoplasmique. Ce recrutement empêche la liaison et l'activation de protéines G hétérotrimériques au récepteur et arrête la signalisation (Krupnick and Benovic, 1998; Lohse et al., 1990; Perry and Lefkowitz, 2002). Ce type de désensibilisation a été démontré chez différents récepteurs tels que le récepteur β_2 -adrénergique (Pippig et al., 1993) et le récepteur muscarinique (Schlador and Nathanson, 1997).

1.12.1.1 Les kinases des RCPG (GRK)

La famille des kinases des RCPG (GRK) comprend 7 membres dont 4 d'entre eux sont exprimés de façon ubiquiste (GRK2, 3, 5 et 6) (Ferguson, 2001; Penela et al., 2003). Tel que représenté sur la figure 5, les GRK sont composés de trois domaines soit un pour la liaison au RCPG connu sous le nom de domaine RGS (régulateur de la signalisation des protéines G), un domaine central catalytique et un domaine C-terminal hypervariable permettant le recrutement des GRK à la membrane. Le mode de recrutement des GRK à la membrane plasmique peut s'effectuer soit par un ancrage direct provenant de modifications post-traductionnelles en région C-terminale (GRK 1, 4, 6 et 7) ou via une

liaison à une protéine intermédiaire telle la sous-unité G $\beta\gamma$ (GRK 2 et 3) (Penn et al., 2000). Des modifications postraductionnelles par des résidus lipidiques soit la farnésylation (GRK1), la palmitoylation (GRK4) ou la géranylgéranlyation (GRK7) permettent aux GRK de s'associer à la membrane, et ce, même en l'absence d'une activation par un agoniste (Krupnick and Benovic, 1998; Penn et al., 2000). Or, la GRK5 se sert de son domaine très basique pour lier les phospholipides de la membrane par des interactions électrostatiques (Ferguson et al., 1996). Les GRK2 et 3, quant à eux, sont localisées à l'état non-stimulé dans le cytosol, mais transloquent à la membrane après l'activation des RCGP (Penn et al., 2000). La liaison des GRK2 et 3 à la sous-unité G $\beta\gamma$ permet d'expliquer la localisation de ces kinases à la membrane après stimulation.

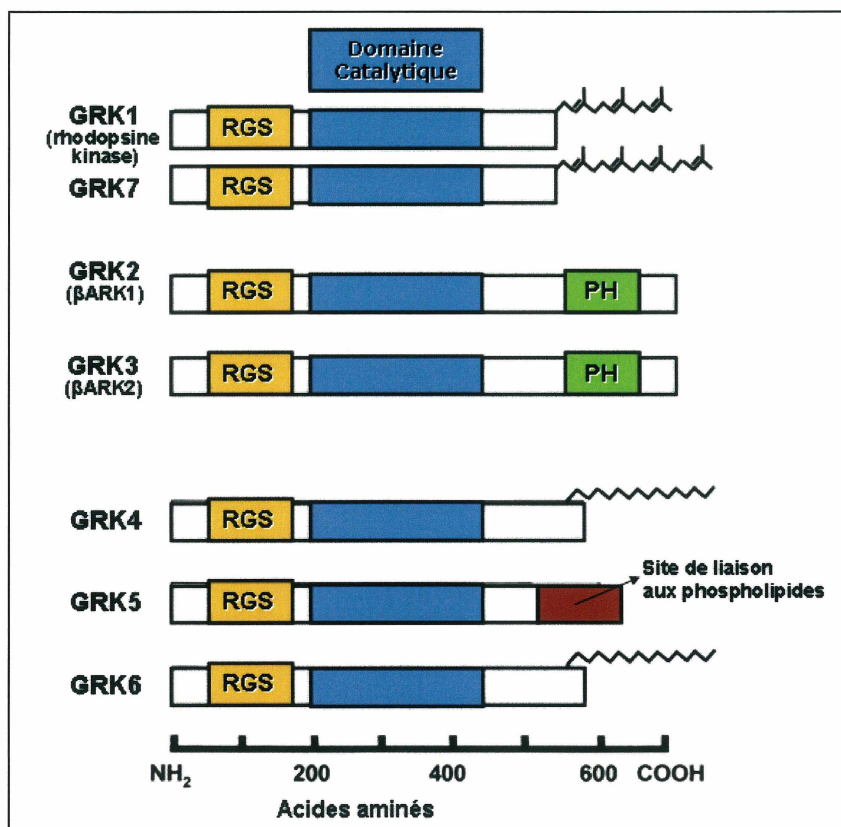


Figure 5 : Représentation schématique de la famille des GRK. Adapté de (Penn et al., 2000).

Les GRK phosphorylent les résidus sérines et thréonines retrouvés dans les boucles intracellulaires et la région C-terminale du récepteur (Benovic et al., 1986). Par exemple, il a été démontré que la GRK2 pouvait induire la phosphorylation de plusieurs récepteurs tels que les récepteurs α et β -adrénergiques, BLT1 et de l'angiotensine II, étant nécessaire pour leur internalisation. Les GRK contribueraient également au recrutement de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) à proximité des récepteurs stimulés (Naga Prasad et al., 2002). L'action de cette enzyme amènerait des modifications lipidiques qui favoriseraient l'association de la molécule adaptatrice AP-2 au complexe récepteur/arrestines (Naga Prasad et al., 2002).

Des études ont montré qu'il existe une voie alternative à la phosphorylation par les GRK pour la phosphorylation des RCPG, soit par les caséines kinases 1 et 2 (CK1 et CK2). La famille CK1 comprend 7 membres (α , β , γ_{1-3} , δ et ϵ) dont l'expression est ubiquitaire et distribué entre la membrane plasmique, le cytoplasme et le noyau. Il a été démontré que la caséine kinase 1 α était capable de phosphoryler les résidus sérines de la 3^{ème} boucle intracellulaire du récepteur muscarinique M3 de façon dépendante à l'agoniste (Tobin et al., 1997). La phosphorylation du récepteur muscarinique M3 par la caséine kinase 1 ne médierait pas la désensibilisation du récepteur mais contrôlerait la magnitude de la réponse en IP₃. La caséine kinase 1 α peut aussi phosphoryler la rhodopsine de manière dépendante à l'agoniste (Budd et al., 2000; Tobin et al., 1997). Par ailleurs, la phosphorylation des sites caséines kinases 2 chez le récepteur à hormone de libération de la thyrotropine est nécessaire pour assurer l'internalisation dépendante des arrestines de ce récepteur (Hanyaloglu et al., 2001).

1.12.1.2 Les arrestines

La famille des arrestines compte quatre membres. Les arrestines 1 et 4 (connues comme arrestines visuelles) sont exprimées de façon exclusive dans les cônes et bâtonnets de la rétine. Les arrestines 2 et 3, quant à elles, sont exprimées dans presque tous les tissus (Sterne-Marr and Benovic, 1995). Les arrestines sont des molécules multifonctionnelles impliquées au niveau de la désensibilisation homologue, la signalisation et l'endocytose de récepteurs (Ferguson, 2001; Ferguson et al., 1996; Krupnick and Benovic, 1998).

Les arrestines possèdent un domaine de liaison à la protéine adaptatrice AP-2 ainsi qu'à la clathrine qui est présenté à la figure 6 (Goodman et al., 1996; Krupnick et al., 1997; Laporte et al., 2000). Le groupe de Caron a rapporté que les formes mutantes des arrestines, dépourvues des deux résidus arginines essentiels à l'interaction avec AP-2, ne sont plus recrutées aux puits de clathrine après stimulation (Laporte et al., 2000). L'interaction des arrestines avec AP-2 suggère que les arrestines sont des ponts moléculaires entre AP-2, le RCPG et la clathrine (Laporte et al., 2000). Il a été également démontré in-vitro que les arrestines lient la clathrine avec une forte affinité (Goodman et al., 1996). Toutefois, les arrestines ne sont pas suffisantes pour induire l'endocytose par les vésicules de clathrine. Contrairement à AP-2, les arrestines seules ne peuvent pas initier la polymérisation de la clathrine (Goodman et al., 1997).

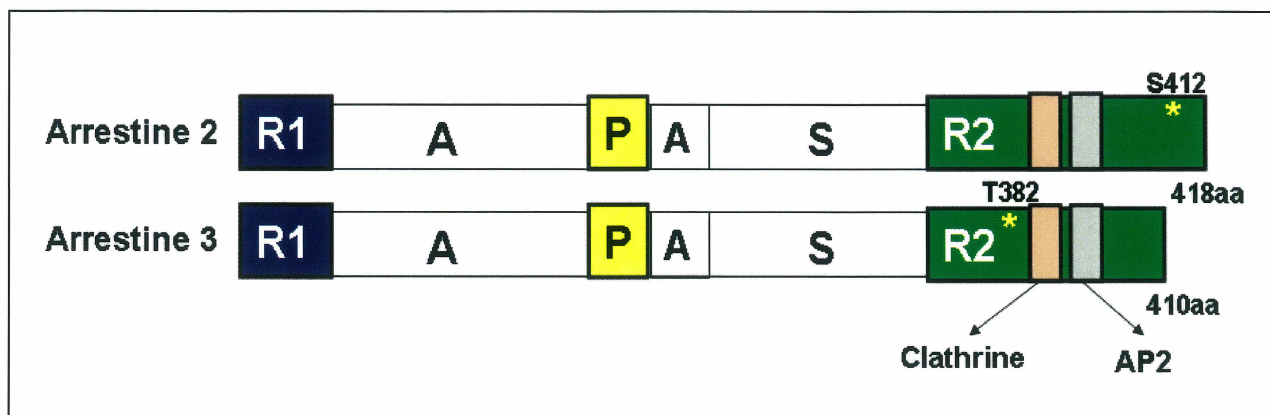


Figure 6 : Représentation schématique de la structure de l'arrestine 2 et 3. Les arrestines sont composées de plusieurs domaines fonctionnels. Tout d'abord, nous retrouvons une région régulatrice N-terminale (R1) et C-terminale (R2), un domaine de reconnaissance de l'état activé du récepteur (A), un domaine de reconnaissance du degré de phosphorylation du récepteur (P) ainsi qu'un site secondaire d'interaction avec le récepteur. Les arrestines possèdent également un site de liaison à la clathrine ainsi qu'un site de liaison à la molécule adaptatrice AP-2 (Laporte et al., 2000). Les étoiles représentent les sites de phosphorylation des arrestines par leurs kinases respectives (S412 et T382). Adapté de (Ferguson, 2001).

Des études ont démontré que certains RCPG, par exemple le récepteur $\beta 2$ -adrénergique, s'associent de façon préférentielle à l'arrestine 3, tandis que d'autres RCPG, tel le récepteur de l'angiotensine II de type 1A, lient de façon équivalente les arrestines 2 et 3 (Anborgh et al., 2000; Oakley et al., 1999; Zhang et al., 1999). Il existe différents patrons d'interactions possibles des récepteurs internalisés avec les arrestines. Les RCPG sont divisés en deux classes (A et B) selon leur association avec les arrestines après l'endocytose (Oakley et al., 2000). Les RCPG de classe A, tel le récepteur $\beta 2$ -adrénergique, s'associent de façon transitoire aux arrestines et sont rapidement déphosphorylés et recyclés à la membrane (Anborgh et al., 2000; Oakley et al., 1999). Par contre, les RCPG de classe B, tel le récepteur Vasopressine de type II, cointernalisent et s'associent fortement avec les arrestines. Ces récepteurs sont plus longtemps retenus

dans les endosomes, sont recyclés très lentement à la membrane et ont tendance à être transportés aux lysosomes pour être dégradés (Anborgh et al., 2000; Oakley et al., 1999; Trejo and Coughlin, 1999).

En ce qui concerne le récepteur CysLT1, Naik et al. ont démontré que l'internalisation du CysLT1 est indépendante des arrestines (Naik et al., 2005). Lorsqu'ils ont surexprimé les arrestines sauvages, ils ont significativement augmenté l'internalisation du CysLT1. Toutefois, l'expression de mutants et dominants négatifs d'arrestines 2 et 3 a eu un effet minime sur l'internalisation du récepteur CysLT1. Les mutants qu'ils ont étudiés sont les suivants : arr2(R169E) et arr3(R170E) dont la liaison au RCPG est indépendante de la phosphorylation du récepteur. Le premier dominant négatif d'arrestine 2 était arr2-LIELD/F391A qui a la propriété de se lier au RCPG mais pas la clathrine/AP-2. Le second dominant négatif, arr2-R169E/LIELD/F391A, est à la base la même construction que celle présentée précédemment mais elle possède en plus une mutation dans son domaine P de reconnaissance du degré de phosphorylation du récepteur qui lui confère une plus grande affinité pour les RCPG. Le groupe de Penn a aussi obtenu une internalisation notable du récepteur CysLT1 dans des fibroblastes d'embryon murin déficients en arrestine-2 et 3 comparativement au récepteur β 2-adrénérrique qui a perdu sa capacité d'internalisation chez ces cellules. Leurs expériences suggèrent donc que les arrestines ne sont pas essentielles pour l'internalisation du CysLT1 (Naik et al., 2005).

Les protéines kinases A et C, plutôt associées à la désensibilisation hétérologue, peuvent également participer à la désensibilisation homologue suite à une stimulation avec le

ligand (Chuang et al., 1996). À de hautes concentrations de ligand, les deux classes de kinases contribuent toutes les deux à la désensibilisation homologue. Tandis qu'en présence d'une faible concentration de ligand, la participation des GRK serait prédominante. Il a été démontré notamment que la PKC est impliquée dans la phosphorylation des récepteurs activés par un agoniste tels que le récepteur de l'angiotensine II de type I (Oppermann et al., 1996), le récepteur EDG (Watterson et al., 2002), le CXCR4 (Haribabu et al., 1997), le récepteur chimiokine CCR5 (Pollok-Kopp et al., 2003) et le récepteur somatostatine 2A (Elberg et al., 2002).

Le groupe de Penn a étudié l'activité des protéines kinases C (PKC) dans l'internalisation du CysLT1. Un prétraitement avec le BisI, un inhibiteur spécifique des PKC, a diminué de façon importante l'internalisation et la désensibilisation du récepteur comparativement au récepteur de l'histamine H1 qui n'a pas été affecté (Naik et al., 2005). La mutation d'un des sites de phosphorylation de PKC dans la queue C-terminale (CysLT1S(313-316)A) a réduit l'internalisation du récepteur et augmenté la production d'inositol phosphates ainsi que la mobilisation calcique (Naik et al., 2005). Le groupe de Penn a donc montré que la désensibilisation du CysLT1 menant à l'internalisation du récepteur est dépendante de la protéine kinase C.

1.12.2 Désensibilisation hétérologue

La désensibilisation hétérologue est indépendante de l'état de conformation du récepteur et donc de la liaison de l'agoniste au récepteur (Chuang et al., 1996). Brièvement, ce type de désensibilisation survient soit lorsqu'un récepteur non-occupé par un ligand est

phosphorylé. Elle peut également se produire lorsqu'un récepteur qui n'est pas responsable de l'activation des protéines kinase A et C (PKA et PKC) est phosphorylé. Ce type de désensibilisation fait intervenir les protéines kinases A et C (PKA et PKC), qui sont activées par les seconds messagers, respectivement par l'AMPc et les diacylglycérols (DAG) et/ou le calcium pour certaines isoformes de PKC (Chuang et al., 1996; Mayor et al., 1998). Ces protéines vont phosphoryler lentement (minutes) le récepteur sur des sites différents des kinases couplées aux protéines G (GRK), maintenant ainsi le récepteur dans son état de faible affinité pour l'agoniste (Chuang et al., 1996).

Récemment, il a aussi été démontré que le récepteur CysLT1 peut être désensibilisé de façon hétérologue soit par un nucléotide extracellulaire, l'ATP-UDP. Toutefois, cette désensibilisation dépendante de la protéine kinase C ne permet pas l'internalisation des récepteurs mais amène un rétablissement rapide de la fonctionnalité du récepteur CysLT1 contrairement à une désensibilisation homologue induite par le LTD₄ (Capra et al., 2005).

1.13 VOIES D'INTERNALISATION DES RCPG : GÉNÉRALITÉS

Les récepteurs peuvent être transportés vers l'intérieur de la cellule par une grande variété de mécanismes qui sont représentés à la figure 7. Parmi ceux-ci, il y a des voies d'internalisation dépendantes des vésicules de clathrine ainsi ou indépendantes de ces dernières soit via les radeaux lipidiques et/ou les caveolae. Les récepteurs peuvent emprunter plus d'une voie d'internalisation dépendamment du type cellulaire, de la concentration du récepteur et/ou du type et de la concentration du ligand (Brown and Greene, 1991).

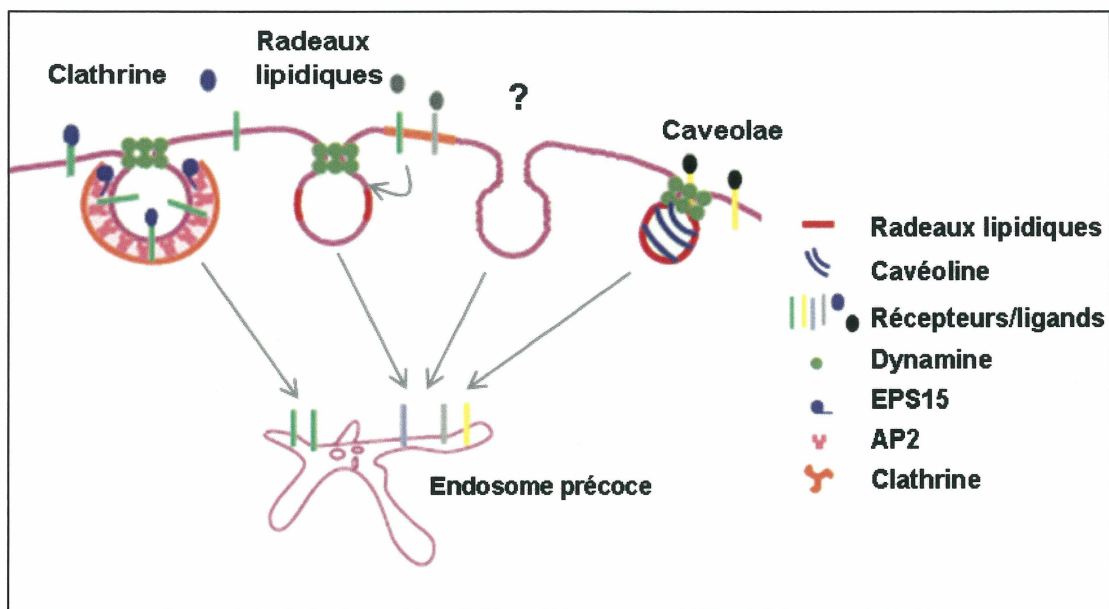


Figure 7 : Représentation schématique des voies potentielles d'internalisation des RCPG. La voie dépendante des vésicules de clathrine, la voie dépendante des radeaux lipidiques ainsi que la voie dépendante des caveolae nécessitent toutes l'action de la dynamine. Adapté de (Benmerah and Lamaze, 2002).

La voie d'internalisation empruntée par la majorité des RCPG est la voie dépendante des vésicules de clathrine qui implique de façon générale les kinases de RCPG (GRK), les arrestines, la dynamine et bien entendu les puits de clathrine. Il a été démontré que les récepteurs β 2-adrénrgiques (Goodman et al., 1996; Zhang et al., 1996a), les récepteurs thromboxanes A2 de type β (Parent et al., 1999) ainsi que les récepteurs du PAF (Le Gouill et al., 1997) internalisent via cette voie.

Par contre, certains récepteurs font exception à la règle et empruntent des voies qui sont dites indépendantes de la présence des arrestines mais dépendantes ou non de la dynamine. Il a été montré que les récepteurs muscariniques M2 (Pals-Rylaarsdam et al., 1997), les récepteurs angiotensines II de type 1A (Zhang et al., 1996a) et les récepteurs

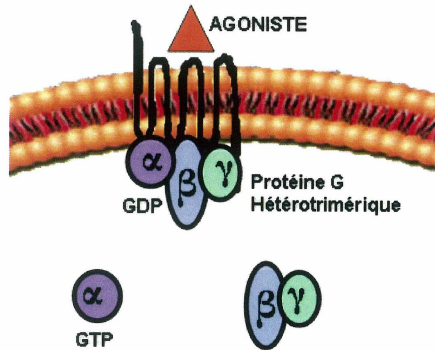
dopamines D2 (Vickery and von Zastrow, 1999) internalisent de manière indépendante des arrestines ainsi que de la dynamine. Toutefois, la machinerie nécessaire pour permettre l'internalisation de ces récepteurs reste à être définie. Les récepteurs qui ont montré un patron d'internalisation indépendant des arrestines mais dépendant de la dynamine sont le récepteur BLT1 (Chen et al., 2004) et les récepteurs muscariniques M1, M3 et M4 chez les cellules HEK293 (Lee et al., 1998; Vogler et al., 1998). Toutefois, il a été démontré que le BLT1 internalise via la voie dépendante des vésicules de clathrine. Le groupe de Popova et al. a aussi démontré que l'internalisation du récepteur muscarinique M3 est dépendante des vésicules de clathrine et suggère que l'interaction entre la tubuline et la dynamine guiderait ou insérerait le complexe dans les puits de clathrine (Popova and Rasenick, 2004). Ces données indiquent qu'une internalisation dépendante des vésicules de clathrine et de la dynamine mais indépendante des arrestines peut être envisageable.

La localisation de certains RCPG a été observée dans des structures membranaires lisses dénuées de clathrine suggérant que certains RCPG pourraient internaliser via des voies indépendantes des vésicules de clathrine telles que les radeaux lipidiques ou les caveolae (Raposo et al., 1989; Raposo et al., 1987). Les caveolae (50 à 80 nm) prennent forme lorsqu'un radeau lipidique est invaginé et enrichi de la protéine cavéoline (Benmerah and Lamaze, 2002; Razani and Lisanti, 2001). Différentes études ont permis d'identifier des récepteurs internalisant par la voie dite dépendante des caveolae tels que les récepteurs β 2-adrénergiques (Raposo et al., 1989), angiotensines II de type 1 (Ishizaka et al., 1998), à l'endothéline ETA (Chun et al., 1994), bradykinines B2 (Haasemann et al., 1998) ainsi

que les récepteurs "calcium-sensing" (CaR) (Kifor et al., 1998). Cette voie d'internalisation requiert la molécule dynamine qui est essentielle pour la fission des vésicules de caveolae (Henley et al., 1998; Oh et al., 1998).

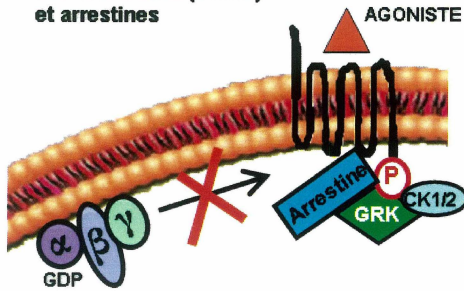
Certains récepteurs empruntent même à la fois la voie dépendante des vésicules de clathrine et celle dépendante des caveolae tels que le récepteur β 2-adrénergique (Rapacciuolo et al., 2003) et le récepteur de l'endothéline ETA (Okamoto et al., 2000; Roettger et al., 1995)

1. Activation des voies de signalisation liaison de l'agoniste au récepteur



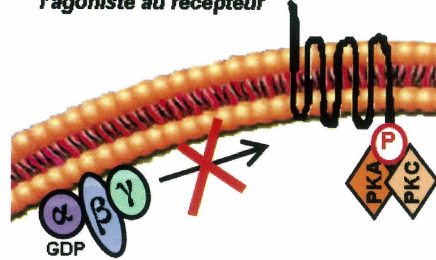
Activation de diverses voies de signalisation

2.1 Désensibilisation homologue : Kinase de RCPG (GRK) / caséine kinase (CK1/2) et arrestines

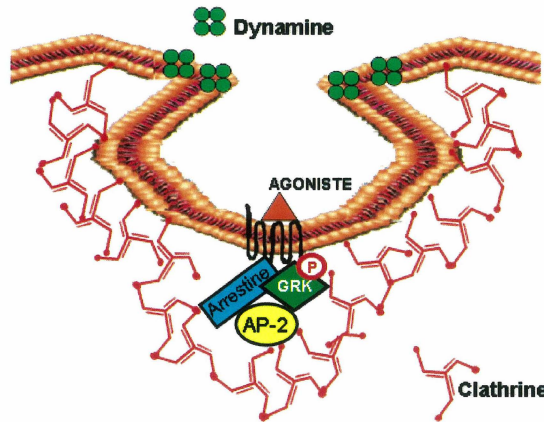


2.2 Désensibilisation hétérologue : protéine kinase A, C (PKA, PKC)

Indépendante de la liaison de
l'agoniste au récepteur



3. Formation de la vésicule de clathrine : AP-2 (protéine adaptatrice 2), clathrine, dynamine



4. Routage intracellulaire du récepteur : Rab GTPase

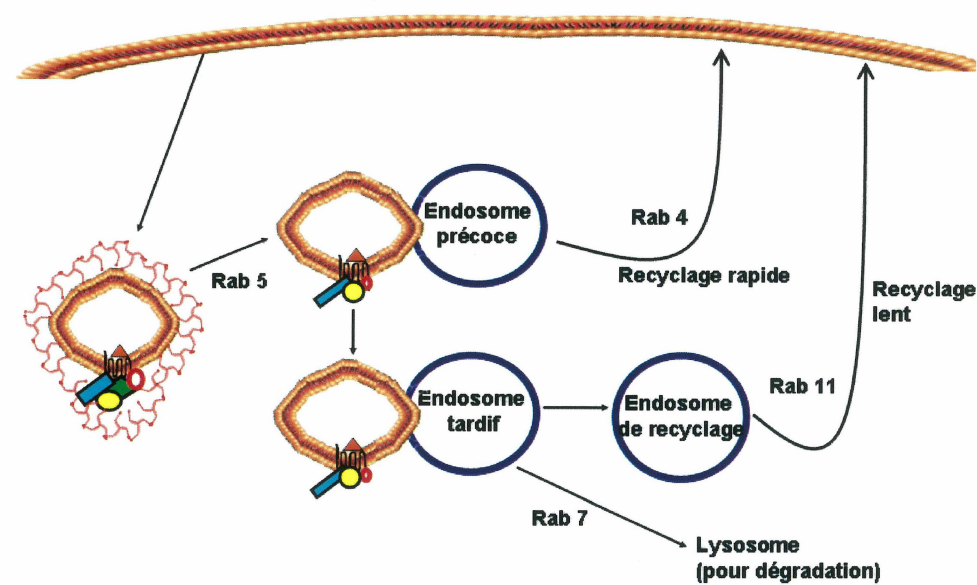


Figure 8 : Modèle canonique d'internalisation des RCPG via la voie dépendante des vésicules de clathrine.

Lorsque le ligand se lie à un récepteur, le récepteur interagit avec une protéine G hétérotrimérique qui se dissocie en sous-unités α -GTP et $\beta\gamma$, qui peuvent activer différents effecteurs cellulaires (Figure 1). Très rapidement les RCPG sont phosphorylés par des kinases spécifiques GRK (Figure 2.1) ou les protéines kinases A ou C (Figure 2.2). Cette phosphorylation a pour effet d'augmenter l'affinité pour les arrestines. La liaison de l'arrestine aux RCPG favorise l'entrée du cargo via la voie d'endocytose par les vésicules de clathrine. En effet, l'arrestine interagit avec la sous-unité β d'AP-2 et cette protéine adaptatrice établit un pont moléculaire entre le complexe récepteur- β -arrestine et la clathrine (Figure 3). Une fois le compartiment endosomique atteint (Figure 4), le devenir des récepteurs internalisés est variable. Le plus souvent, les récepteurs sont déphosphorylés et recyclés vers la membrane plasmique, où ils peuvent à nouveau être stimulés. Or, certains récepteurs ne recyclent pas et sont dirigés vers le compartiment lysosomal pour y être dégradés.

1.14 INTERNALISATION DES RCPG PAR LES VÉSICULES DE CLATHRINE

Un schéma résumant de la voie canonique d'internalisation par les vésicules de clathrine comprenant les étapes de désensibilisation et de routage intracellulaire des récepteurs est présenté à la Figure 8. Suite à la désensibilisation, les molécules adaptatrices AP-2 sont recrutées aux récepteurs dans les puits de clathrine en formation et créent des sites de polymérisation pour la clathrine. Les molécules AP-2 fixent la clathrine et la membrane s'invagine jusqu'à l'obtention d'une vésicule enrobée de clathrine qui piège les récepteurs (Kirchhausen, 1999; Schmid, 1997). Pour permettre le détachement de la vésicule, la dynamine est recrutée au niveau du col de celle-ci. Par sa fonction GTPasique, la dynamine va permettre la libération de la vésicule de clathrine.

1.14.1 Motifs d'internalisation

Plusieurs groupes ont montré l'importance dans le processus d'internalisation des résidus tyrosines présents dans la troisième boucle intracellulaire ou l'extrémité carboxy-terminale des RCPG. Il existe 2 grandes familles de motifs d'internalisation basées sur la présence de tyrosine (Y) : les motifs NP_{X(1-2)}Y présents chez les membres de la famille du récepteur LDL ainsi que les motifs YxxΦ (Φ=résidu hydrophobe) présents chez le récepteur de la transferrine (YTRF) (Bonifacino and Dell'Angelica, 1999; Kirchhausen, 1999). Il existe aussi un motif contenant deux résidus leucines appelé motif dileucine (Bonifacino and Dell'Angelica, 1999). Par la technique du double-hybride, il a été démontré qu'il y avait interaction entre les récepteurs disposant d'un motif YxxΦ et la sous-unité μ2 du complexe AP-2 (Boll et al., 1996; Ohno et al., 1995). Les signaux

dileucines semblent également interagir avec les sous-unités μ et β de AP-2 (Hofmann et al., 1999; Ohno et al., 1995).

1.14.2 La molécule adaptatrice AP-2

Quatre complexes AP (protéine adaptatrice) ayant des distributions intracellulaires différentes ont été identifiés : AP-1, AP-2, AP-3 et AP-4. La molécule AP-2, exprimée uniquement à la membrane plasmique, est en fait un complexe de protéines de 2453 acides aminés, schématisé à la figure 9A, qui comprend quatre sous-unités : α et β -adaptines (100kDa) ainsi que μ 2 et σ 2 (50 et 20kDa respectivement) (Kirchhausen, 1999; Schmid, 1997). Ces sous-unités sont très fortement associées mais sont inactives sous forme de monomères. La protéine AP-2 possède différents domaines de liaison pour la clathrine, les arrestines, la dynamine, EPS15 ainsi que pour les récepteurs possédant des motifs tyrosines Yxx Φ ou dileucines représentés à la figure 9B (Benmerah et al., 1996; Chen et al., 1998; Marmor and Yarden, 2004; Owen et al., 1999; Shih et al., 1995; Traub et al., 1999; Wang et al., 1995).

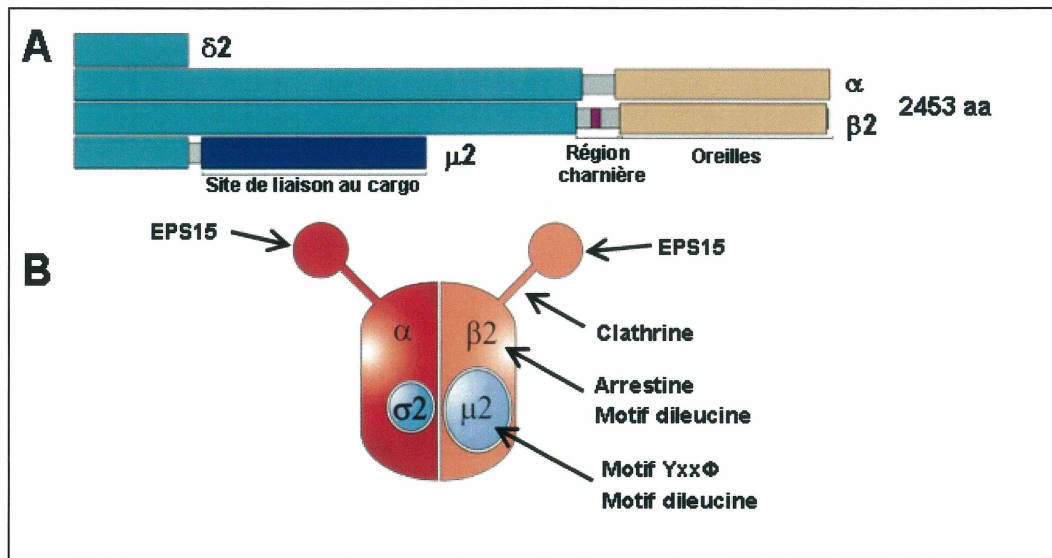


Figure 9 : Schéma de l'organisation structurale de la protéine adaptatrice AP2.

En A, la structure de cet important complexe est représentée avec ses quatre chaînes : α et β adaptines, μ 2 et δ 2. Tridimensionnellement, le complexe AP-2 prend la forme de la tête de Mickey avec une tête et deux oreilles, schématisé en B. Les différents partenaires d'interaction avec AP2 sont également indiqués en B. Figures adaptées de (Benmerah and Lamaze, 2002) et (Mousavi et al., 2004).

Nesterov et al. ont montré que le récepteur de la transferrine est lié à la sous-unité μ de AP-2 grâce à son motif tyrosine (séquence YTRF) (Nesterov et al., 1999). Les molécules AP-2 peuvent être recrutées à la membrane indépendamment d'une association avec les récepteurs parce qu'il a été démontré qu'elles ont la capacité d'interagir directement avec la membrane plasmique (Page and Robinson, 1995; Zhu et al., 1999). AP-2 serait lié de façon électrostatique aux charges négatives présentes à la surface cellulaire (Owen and Evans, 1998). Les fonctions principales d'AP-2 sont d'assembler les triskélions de clathrine sous forme de cages et d'assurer leur qualité c'est-à-dire que les cages formées soient de tailles homogènes (Shih et al., 1995). La molécule AP-2 est également

impliquée dans la déformation de la membrane plasmique lors de la formation des vésicules (Takei et al., 1998).

1.14.3 La clathrine

La clathrine représente le constituant majeur des puits et des vésicules de clathrine. La clathrine s'assemble sous forme de triskèle, constitué de 3 chaînes lourdes (190 kDa) associées à un domaine C-terminal et de trois chaînes légères (30 kDa) (Smith and Pearce, 1999). La partie N-terminale des chaînes lourdes contient un motif consensus permettant d'interagir avec de nombreuses protéines telles que les arrestines et des sous-unités de AP-2 telles les β -adaptines (Lafer, 2002; Shih et al., 1995).

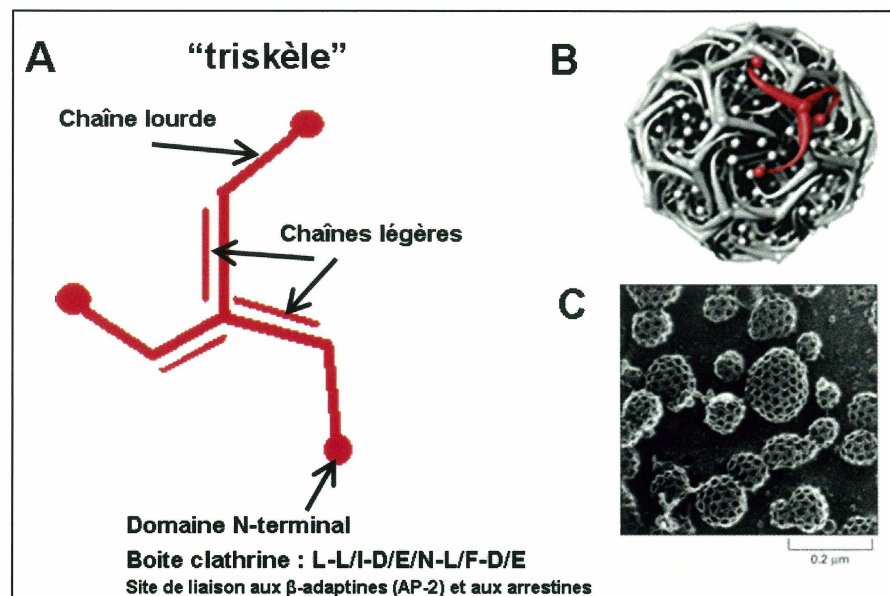


Figure 10 : Schéma de l'organisation structurale de la clathrine.

L'unité fonctionnelle de la clathrine est le triskèle, représenté en A. Le triskèle est composé de 3 chaînes lourdes et trois chaînes légères. Le domaine N-terminal contient la boîte clathrine qui possède des sites de liaison aux β -adaptines et aux arrestines. L'autoassemblage de ces triskèles forme des cages de clathrine tel que montré en B, structure réalisée par Tomas Kirchhausen (Musacchio et al., 1999; Yarrow, 1999). En C,

la photographie de microscopie électronique montre les cages de clathrine (Alberts, 2002).

In vitro, les triskèles de clathrine s'auto-assemblent pour former des structures ressemblant à des cages étant illustrées à la figure 10 (Benmerah and Lamaze, 2002; Kirchhausen, 2000). L'activité d'assemblage des triskèles serait menée par les chaînes lourdes (Benmerah and Lamaze, 2002). La clathrine, tout comme l'AP-2, peut induire la déformation de la membrane au début de l'endocytose pour créer les puits de clathrine (Benmerah and Lamaze, 2002; Takei et al., 1998)

1.14.4 Autres partenaires d'interaction impliqués dans l'endocytose

D'autres partenaires, qui n'ont pas été décrit précédemment, s'ajoutent à la liste des trois acteurs bien connus (la clathrine, AP-2 et la dynamine) impliqués dans la formation des vésicules de clathrine (Maldonado-Baez and Wendland, 2006).

La protéine EPS15 est associée de façon constitutive et ubiquiste au complexe AP-2 par une interaction directe avec la sous-unité α -adaptine (Benmerah et al., 1996). Elle serait impliquée au niveau de la régulation de l'assemblage de cages de clathrine (Maldonado-Baez and Wendland, 2006). L'expression de différents mutants d'EPS15 inhibe l'internalisation par la voie dépendante des vésicules de clathrine (Benmerah and Lamaze, 2002).

L'intersectine (ou DAP160) possède des domaines EH en amino-terminal et 5 domaines SH3 en C-terminal, interagissant avec la dynamine. Sa fonction n'a pas été clairement

déterminée, mais l'intersectine pourrait intervenir dans le recrutement de la dynamine aux vésicules de clathrine (Benmerah and Lamaze, 2002).

ARF6 promouvoit l'invagination de la membrane lors de l'endocytose. En effet, il agit sur les lipides membranaires et le recrutement de protéines adaptatrices telles que la clathrine et AP-2 (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006; Paleotti et al., 2005). ARF6 joue également un rôle dans la réorganisation des fibres d'actine (Claing, 2004).

1.15 RADEAUX LIPIDIQUES ET DES CAVEOLAE : GÉNÉRALITÉS

Les radeaux lipidiques sont des microdomaines de la membrane plasmique formés d'une coalescence de cholestérol et sphingolipides. Les caveolae sont généralement considérés comme une forme spécialisée et invaginée de radeaux lipidiques. Les caveolae ont une morphologie unique due à l'enrichissement en cavéolines et se présentent sous forme d'oligomères (14 à 16 molécules) (Galbiati et al., 2001b; Rothberg et al., 1992; Sargiacomo et al., 1995). Les différences de composition biochimique des radeaux lipidiques et des caveolae sont montrées à la figure 11.

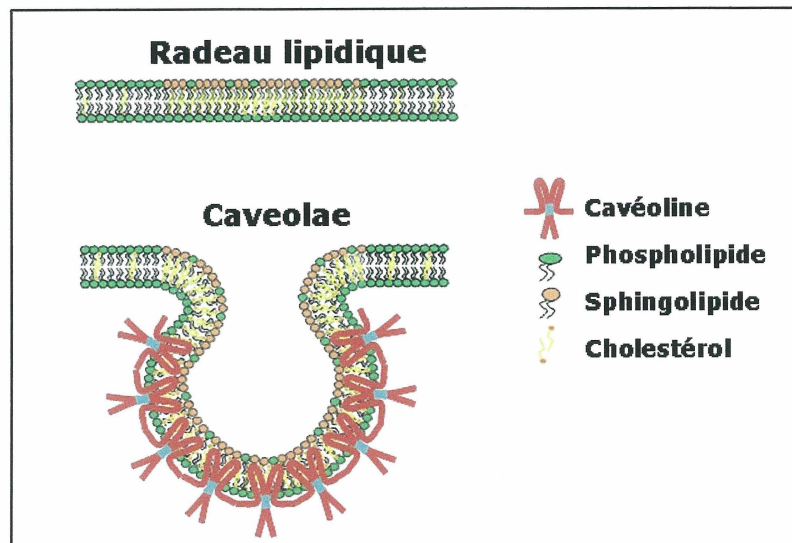


Figure 11 : Composition biochimique des radeaux lipidiques et des caveolae. Adapté de (Galbiati et al., 2001b).

1.15.1 La cavéoline et ses fonctions

La cavéoline possède des motifs de liaison spécifiques permettant de lier les RCPG et les protéines G (Couet et al., 1997; Okamoto et al., 1998). La formation des caveolae est dépendante de l'expression de la cavéoline-1 chez les cellules non-musculaires et de la cavéoline-3 chez les cellules musculaires (Drab et al., 2001; Galbiati et al., 2001a). La cavéoline est importante pour la formation des caveolae car les souris déficientes pour la cavéoline 1 ne présentent pas de structures cavéolaires (Drab et al., 2001). Toutefois, la réintroduction de la cavéoline chez ces souris déficientes permet la création de caveolae (Drab et al., 2001).

La cavéoline-1 possède trois sites de palmitoylation en C-terminal qui sont nécessaires pour la liaison et le transport du cholestérol aux caveolae (Dietzen et al., 1995; Uittenbogaard and Smart, 2000). La cavéoline-1 a aussi des sites de phosphorylation en

N-terminal qui jouent un rôle important dans le bourgeonnement des caveolae (Li et al., 1996).

1.15.2 Endocytose par les caveolae

La destinée du cargo par la voie d'endocytose dépendante des caveolae n'est pas très bien connue. Un modèle a été proposé par l'équipe d'Anderson où la cavéoline-1 se déplacerait de son site de synthèse vers différents compartiments cellulaires. La cavéoline est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi (Monier et al., 1995). Une fois dans le Golgi, elle s'oligomérisse et devient alors un détergent insoluble (Lisanti et al., 1993). Le transport des vésicules à la surface dépend ainsi de l'oligomérisation de la cavéoline et de certains acides aminés. Une fois que les vésicules ont atteint la surface, la cavéoline-1 est incorporée dans des caveolae fonctionnels qui peuvent à nouveau s'internaliser et se recycler. À l'intérieur de la cellule, les caveolae internalisés fusionnent aux endosomes précoces (Pelkmans et al., 2004). Dépendamment du type cellulaire, les caveolae enrichis en cavéoline peuvent relâcher leur contenu à l'appareil de Golgi ou au RE (Machleidt et al., 2000). Au réticulum endoplasmique, la cavéoline-1 peut transporter le cholestérol nouvellement synthétisé vers les caveolae (Liu et al., 2002; Razani and Lisanti, 2001).

Il a été montré que l'inhibition de l'activité tyrosine-kinase empêche l'endocytose via les caveolae (Parton et al., 1994; Pelkmans et al., 2002). De plus, l'expression d'un dominant négatif de Src (qui phosphoryle la cavéoline et la dynamine) et de la protéine kinase Ca

ou un traitement avec des inhibiteurs de ces kinases, inhibe également l'endocytose par les caveolae (Shajahan et al., 2004; Sharma et al., 2004).

1.16 LE DÉTACHEMENT DES VÉSICULES PAR LA DYNAMINE

Il existe trois isoformes de la dynamine : la dynamine 1, 2 et 3. La dynamine 1 est exprimée uniquement dans le cerveau. La dynamine 2 est exprimée de façon ubiquiste tandis que la dynamine 3 est exprimée seulement dans les testicules (McNiven et al., 2000). La dynamine contient plusieurs domaines fonctionnels dont un domaine C-terminal riche en proline pouvant interagir avec une protéine à domaines SH3 (McNiven et al., 2000). Le mutant K44A de la dynamine 1 a été le premier mutant dominant négatif de l'endocytose dépendante des vésicules de clathrine (Schmid et al., 1998). Ce mutant n'est pas fonctionnel car il ne peut plus lier et hydrolyser le GTP (Schmid et al., 1998). La dynamine a pour rôle principal de couper les vésicules au niveau du col pour permettre leur entrée dans la cellule. Cette fonction de scission n'est pas exclusive à la voie d'endocytose via les vésicules de clathrine car elle est également nécessaire à la voie d'endocytose dépendante des caveolae (Benmerah and Lamaze, 2002; Schmid et al., 1998).

1.17 LE DEVENIR DES VÉSICULES ENDOCYTÉES

Les vésicules internalisées sont ensuite débarrassées de leur manteau de clathrine et fusionnent avec les endosomes précoces ou de tri. Le mouvement des RCPG internalisés entre les compartiments vésiculaires intracellulaires est régulé par les GTPases Rab

(Ferguson, 2001; Novick and Zerial, 1997; Rosenfeld et al., 2002; Seachrist and Ferguson, 2003). En premier lieu, le pH acide à l'intérieur des endosomes favorise la dissociation du ligand au récepteur (Krueger et al., 1997). Ensuite, le récepteur libéré du ligand est déphosphorylé par des phosphatases (Pitcher et al., 1995) et peut être recyclé à la membrane plasmique où il peut être à nouveau stimulé. À partir des endosomes précoces, le cargo peut subir un autre destin tel qu'être dirigé vers les endosomes tardifs et subséquemment vers les lysosomes pour être dégradé. Les mécanismes moléculaires qui dirigent les récepteurs vers les lysosomes incluent une forte affinité pour les arrestines, l'ubiquitinylation de la région cytoplasmique ou l'association avec des protéines de tri (Gagnon et al., 1998; Shenoy et al., 2001; Whistler et al., 2002).

1.18 L'ACTINE ET L'ENDOCYTOSE DES RÉCEPTEURS

L'actine est impliquée dans la migration cellulaire mais également dans différentes formes d'internalisation telles que l'endocytose via les vésicules de clathrine ainsi que par les caveolae (Fenteany and Glogauer, 2004; Mundy et al., 2002; Murray and Wolkoff, 2003; Yarar et al., 2005). La polymérisation de l'actine semble fournir une force pour la déformation et le mouvement de la membrane lors des différentes étapes de l'endocytose (Yarar et al., 2005). Merrifield et al. ont remarqué une corrélation entre l'augmentation de l'intensité de la polymérisation de l'actine et la translocation du signal clathrine à partir de la membrane plasmique (Merrifield et al., 2002). Le groupe de Almers a également rapporté que la scission des vésicules se produit lorsque les pics de polymérisation de l'actine sont maximaux (Merrifield et al., 2002). Ces données suggèrent des rôles possibles de l'actine dans l'invagination de la membrane, la scission

des vésicules ainsi que dans le mouvement éventuel des vésicules. L'actine aurait aussi un rôle plus précoce sur l'organisation spatiale et le mouvement latéral des sites d'endocytose via les vésicules de clathrine (Gaidarov et al., 1999). Les composantes du cytosquelette pourraient organiser ou contraindre la mobilité latérale de la machinerie endocytaire en s'associant avec certaines composantes de la machinerie (Qualmann et al., 2000). L'assemblage de l'actine serait également impliqué dans le mouvement des endosomes et des vésicules endocytiques.

Récemment, deux modèles d'endocytose ont été entre autre proposés par le groupe de Drubin (Kaksonen et al., 2006). Le premier modèle comporte une invagination de la membrane plasmique avant que la polymérisation d'actine débute. L'actine est polymérisée à la base du puit de clathrine pour former un réseau de filaments qui pousse la vésicule vers l'intérieur de la cellule (Kaksonen et al., 2006). Le deuxième modèle implique les protéines du complexe Arp 2/3 (protéines reliées à l'actine) qui vont initier la polymérisation de l'actine. Les filaments d'actine vont alors se lier au manteau de clathrine et former un cône autour de celui-ci. Le manteau et la membrane sous-jacente vont être tirés vers l'intérieur de la cellule résultant des mouvements du réseau d'actine en pleine croissance (Kaksonen et al., 2006).

BUT DE L'ÉTUDE

Nous avons en notre possession un outil de recherche très avantageux soit des lignées cellulaires exprimant de façon stable le récepteur CysLT1 ou CysLT2, récepteurs que nous devons étudier. Le but général du projet était d'étudier l'internalisation de ces deux récepteurs et d'identifier les molécules nécessaires dans ce processus.

Notre premier objectif a été d'étudier la dépendance des arrestines pour l'internalisation du récepteur CysLT1. Pour poursuivre de façon logique cette histoire, nous avons investigué la nécessité de certaines molécules impliquées dans la désensibilisation et l'internalisation des récepteurs via des dominants négatifs de GRK, des inhibiteurs des protéines caséines kinases et de protéines kinases A et C. Les voies d'internalisation possibles pour ce récepteur n'ayant pas été démystifiées, il a été de mon devoir de les étudier via des agents connus dans la littérature pour bloquer la voie dépendante des vésicules de clathrine ainsi que la voie dépendante des radeaux lipidiques et des caveolae. Finalement, l'observation d'une réorganisation du réseau d'actine après une stimulation avec l'agoniste nous a amené à vérifier la dépendance de celle-ci et/ou des microtubules pour l'internalisation du récepteur CysLT1.

En comparaison, l'internalisation d'un autre récepteur des cysLTs a été également investiguée soit celle du récepteur CysLT2. À notre grande surprise, ce récepteur internalise initialement très faiblement et s'externalise à la surface cellulaire après de longs temps de stimulation (4 heures) avec le LTC₄. Nos objectifs ont donc été d'étudier

la distribution du récepteur avant et après de longs temps de stimulation et de vérifier la fonctionnalité de ces récepteurs retrouvés à la surface cellulaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 MATÉRIEL UTILISÉ

Cellules	HEK293	ATCC (Manassas, VA, USA)
Matériel de base	BSA (sérum albumine bovine)	Roche Diagnostic (Indianapolis, IN, USA)
	Chlorure de calcium (CaCl_2 anhydre)	BDH Chemicals, WWR International (Ville Mont-Royal, Québec, Canada)
	Chlorure de sodium (NaCl)	Fisher Chemicals (Fair Lawn, New Jersey, USA)
	Dextrose anhydre (Glucose)	Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA)
	Eau Baxter	Baxter Corporation (Toronto, ON, Canada)
	Lait écrémé (poudre instantanée)	Carnation, Nestlé (Suisse)
	Paraformaldéhyde	Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA)
	Triton X-100	MP Biochemicals, LLC (Aurora, Ohio, USA)
	Trizma base	Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA)
Milieux et tampons	DMEM (milieu Eagle modifié de Dulbecco)	Gibco, Invitrogen Corporation (Grand Island, N. Y., USA)
	DPBS (tampon phosphate salin de Dulbecco)	Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA)
	FBS (sérum fœtal bovin)	Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA)
	Généticine (sulfate G-418)	Invitrogen Canada (Burlington, ON, Canada)
	HEPES	Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA)
	Hygromycine B	Wisent Bioproducts (St-Bruno, QC, Canada)
	Pénicilline G	Wisent Bioproducts (St-Bruno, QC, Canada)
	Streptomycine	Wisent Bioproducts (St-Bruno, QC, Canada)
Agent de transfection	FuGENE6	Roche (Laval, QC, Canada)
Agonistes et Antagoniste	LTC ₄ , LTD ₄	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)
	Montélukast	Merck Frosst (Pointe-Claire, QC, Canada)
Agents bloquant l'endocytose via les vésicules de clathrine	Concanavaline A	Calbiochem, EMD Biosciences (Madison USA)
	Sucrose ultra-pure	ICN Biomedicals (Aurora, Ohio, USA)
Agents désorganisant ou extrayant le cholestérol de la membrane	Methyl- β -cyclodextrine (M β CD)	Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA)
	Filipine	Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA)
	Nystatin	Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA)

Agents de dépolymérisation de l'actine/ des microtubules	Cytochalasine D	Calbiochem, EMD Biosciences (Madison, USA)
	Latrunculine B	Calbiochem, EMD Biosciences (Madison USA)
	Colchicine	Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA)
Inhibiteurs de la phosphorylation et de la signalisation	CK1-7 (inhibiteur CK1)	Seikagaku America (Rockville, MD, USA)
	5,6-dichloro-1-B-D-ribofuranosylbenzimidazole, DRB (inhibiteur CK2)	Calbiochem, EMD Biosciences (Madison USA)
	Go6976 (inhibiteur PKC)	Calbiochem, EMD Biosciences (Madison, USA)
	Génistéine (inhibiteur des tyrosines kinases)	Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA)
	GF109203X (inhibiteur PKC)	Biomol Research Laboratory (Plymouth Meeting, PA, USA)
	H89 (inhibiteur PKA)	Biomol Research Laboratory (Plymouth Meeting, PA, USA)
	LY294002 (inhibiteur PI3 kinase)	Biomol Research laboratory (Plymouth Meeting, PA, USA)
	Rottlerin (inhibiteur PKC)	Biomol Research Laboratory (Plymouth Meeting, PA, USA)
Réactif ELISA	Acide citrique anhydre	Fisher Scientific (Fair Lawn, New Jersey, USA)
	H ₂ O ₂ (peroxyde d'hydrogène)	EM Science (Darmstadt, Allemagne)
	Sodium phosphate dibasique	Fisher Scientific, Chemical Manufacturing division (Fair Lawn, New Jersey, USA)
	Tablet O-Phenylenediamine (OPD)	Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA)
Immuno-fluorescence	Gélatine de peau porcine	Sigma-Aldrich Inc (St-Louis, MO, USA)
	Lamelles de microscope (ronde 15mm, 1D épaisseur)	Fisherbrand Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada)
	Lames pour microscope	Surgipath (Richmond, IL, USA)
	Vectashield (H-1000)	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Essais Inositol phosphate	Acide formique (88%)	Fisher Scientific, Chemical Manufacturing division (Fair Lawn, New Jersey, USA)
	Ammonium formate (poudre)	Fisher Scientific, Chemical Manufacturing division (Fair Lawn, New Jersey, USA)
	Colonnes Poly-prep	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
	DMEM sans inositol	United States Biological (Swampscott, MA, USA)
	Liquide à scintillation	GE Healthcare, Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, Québec, Canada)
	LiCl (chlorure de lithium)	J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
	Net-906 Inositol, Myo-[1,2- ³ H(N)]	PerkinElmer (Wellesley, MA, USA)
	PCA (acide perchlorique)	Fisher Scientific, Chemical Manufacturing division (Fair Lawn, New Jersey, USA)

	Résine AG1-X8	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
	TrichloroTrifluoroEthane 1,1,2	Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA)
	Tri-n-octyl amine	Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA)
Anticorps primaires	Anti-arrestine 2 de souris	Transduction laboratories, BD Biosciences (Lexington, KY, USA)
	Anti-arrestine 3 de souris	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
	Anti-clathrine de souris dirigé contre les chaînes lourdes	Affinity BioReagents (Golden, CO, USA)
	Anti-CysLT1 polyclonal C-terminal anti-humain de lapin	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)
	Anti-dynamine de souris	Transduction laboratories, BD Biosciences (Lexington, KY, USA)
	Anti-Grk2 (c-15) IgG polyclonal de lapin	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
	Anti-Grk5 (c-20) IgG polyclonal de lapin	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
	Anti-Grk6 (c-20) IgG polyclonal de lapin	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
	Surnageant d'hybridome anti-c-Myc (de souris)	Anti-Myc 9E10 hybridome, American Type Culture Collection (Manassa, VA, USA)
Anticorps secondaires	IgG de chèvre anti-souris couplé à Alexa Fluor 488	Invitrogen Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA)
	IgG de mouton anti-souris couplé à la HRP (Horseradish Peroxidase) (pour ECL)	GE Healthcare (Baie d'Urfé, Québec, Canada)
	IgG + IgM (H+L) de chèvre anti-souris AffiniPure conjugué à FITC (à la fluorescéine isothiocyanate)	Jackson Immunoresearch laboratories (West Grove, PA, USA)
	IgG de chèvre anti-lapin AffiniPure conjugué à FITC (à la fluorescéine isothiocyanate)	Jackson Immunoresearch laboratories (West Grove, PA, USA)
	F(ab') ₂ de chèvre anti-lapin couplé à TRICT (Rhodamine)	Jackson Immunoresearch laboratories (West Grove, PA, USA)
Sonde de haute affinité dirigée contre la F-actine (colorant d'actine)	Phalloïdine (toxine de champignon) couplée à Texas-Red	Invitrogen Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA)
Colorant de noyau	To-Pro-3-iodide (642/661)	Invitrogen Molecular Probes (Eugene, USA)

3.2 LIGNÉES STABLES DES RÉCEPTEURS CYSLT1 ET CYSLT2

Le vecteur bicistronique pCMVintron-c-Myc-CysLT1 IRES-hygro a été construit dans notre laboratoire. Il code notamment pour c-Myc-CysLT1 et une résistance à l'hygromycine. Cette construction qui est sous le contrôle du promoteur CMV est stabilisée par un intron β -globine en 5'. Des cellules embryonnaires de rein humain, HEK293, ont été cultivées jusqu'à confluence de 50% dans des boîtes de pétri de 60 mm. Elles ont été transfectées de façon stable avec le FuGENE6 en respectant le ratio 2.5 :1 (μ l FuGENE : μ g ADN) avec la construction pCMVintron-cMyc-CysLT1 (4 μ g ADN par pétri). Quarante-huit heures post-transfection, une concentration finale de 300 μ g/ml d'hygromycine a été ajoutée aux cellules. Par la suite, les cellules ont été mises en culture pendant 2 semaines en présence de milieu contenant de l'hygromycine B. Ensuite, une analyse de l'expression de Myc par cytométrie de flux sur les cellules a permis de sélectionner des clones positifs qui ont été maintenus dans 100 μ g/ml d'hygromycine (Thompson et al., 2006). Ces cellules seront à présent nommées 293LT1 dans le mémoire.

La procédure décrite précédemment a également été suivie pour obtenir la lignée stable du récepteur CysLT2 excepté que le plasmide transfecté est pCMVintron-cMyc-CysLT2 et que la généticine est l'agent de résistance. Quarante-huit heures après la transfection, une concentration finale de 800 μ g/ml de généticine a été ajoutée aux cellules. L'analyse des clones positifs a été effectuée de la même façon que pour les 293LT1. Ces clones positifs ont été maintenus dans 800 μ g/ml de généticine et ces cellules seront nommées 293LT2 dans la suite du mémoire.

3.3 CULTURE CELLULAIRE ET TRANSFECTION

Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) riche en glucose, supplémenté avec 10% FBS (sérum bovin foetal), de 100 UI pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Elles ont été maintenues dans un incubateur à 37°C dans un environnement humidifié avec 5% de CO₂. Les transfections transitoires ont été accomplies avec du FuGENE6 selon les directives du manufacturier en respectant un ratio 3 :1 (µl FuGENE : µg ADN). Les expériences ont été réalisées 24 à 48 heures suivant la transfection.

3.4 VECTEURS D'EXPRESSION

Les vecteurs d'expression arrestine-2 GFP, arrestine-3 GFP, arrestine-2 (V53D), arrestine-3 (V54D), arrestine-2 (318-419), arrestine-3 (210-410), GRK2 (K220R) et GRK6 (K215R) ont été généreusement fournis par le Dr. J. Benovic (Jefferson University, Philadelphie, PA). Le Dr M. Caron (Duke University, Durham, NC) nous a permis d'étudier la dynamine en nous fournissant les vecteurs d'expression dynamine1A et son dominant négatif (K44A). Des mutants de délétion de la queue C-terminale du récepteur CysLT1 (304stop, 311stop, 321stop et 327stop) ont été construits par le Dr Christian LeGouill dans notre laboratoire.

3.5 QUANTIFICATION DES RÉCEPTEURS PRÉSENTS À LA SURFACE CELLULAIRE PAR ELISA

Les cellules stables 293LT1 sont amenées à confluence dans une plaque à 96 puits. L'agoniste privilégié du récepteur CysLT1 est le LTD₄ à une concentration de 100 nM, à

37°C, pour la durée désirée. La stimulation a lieu dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) riche en glucose, 15 mM HEPES et 0.1% BSA. Afin d'arrêter la stimulation, les cellules sont incubées pendant 20 minutes, TP (température pièce), avec une solution de paraformaldéhyde 1% diluée dans DPBS (100 µl/puit) (voir Annexe 1 pour la recette de DPBS). Les cellules sont rincées deux fois avec du DPBS (150 µl/puit). Les sites non-spécifiques sont saturés par une incubation avec une solution de BSA 5% diluée dans DPBS (50 µl/puit) pendant 15 minutes à TP. Ensuite, les cellules sont incubées 1 heure, TP, avec l'anticorps primaire (50 µl/puit) soit le surnageant d'hybridome anti-c-Myc dilué 1 :2 dans DPBS 1% BSA. Le surnageant d'hybridome anti-c-Myc reconnaît l'étiquette Myc en N-terminal des récepteurs CysLT1. Des puits sont utilisés comme contrôles sans anticorps primaire où il y a incubation avec seulement DPBS 1% BSA. Les cellules sont rincées deux fois avec du DPBS avant l'ajout de l'anticorps secondaire (50 µl/puit). L'incubation avec l'anticorps chèvre anti-souris conjugué à HRP (peroxydase Horseradish) dilué 1 :2500 dans DPBS 1% BSA dure 30 minutes à TP. Finalement, les cellules sont rincées deux autres fois avec la solution DPBS avant l'ajout du substrat activé avec H₂O₂ (100 µl/puit). La recette de ce substrat comprend du H₂O, du sodium phosphate dibasique, de l'acide citrique, de l'OPD et est activé avec du H₂O₂ tout juste avant d'être ajouté aux cellules (voir Annexe 1). Le substrat réagit avec les cellules pendant 10 à 20 minutes avant qu'une analyse colorimétrique soit effectuée par l'entremise du lecteur de plaques BioRad (Hercules, CA, USA) à λ250. Pour connaître la façon d'analyser les résultats obtenus, voir la section 3.9.

3.6 ANTAGONISTES, BLOQUEURS DE LA VOIE DÉPENDANTE DES VÉSICULES DE CLATHRINE ET DES RADEAUX LIPIQUES/CAVEOLAE, AGENTS DE DÉPOLYMÉRISATION DE L'ACTINE, INHIBITEURS DE LA SIGNALISATION

Dans le cas d'essais de blocage de l'internalisation du récepteur CysLT1, l'agent bloqueur doit être incubé avec les cellules pendant le temps recommandé avant d'être mis en présence de l'agoniste.

Le Montelukast, un antagoniste du CysLT1, est préincubé pendant 1 heure, à une concentration finale de 1 μ M, avant la stimulation avec l'agoniste. La pré-incubation se fait dans le même milieu que la stimulation, soit du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) riche en glucose, 15 mM HEPES et 0.1% BSA.

Des inhibiteurs des caséines kinases 1 et 2, soit respectivement le CK1-7 (50 μ M) et DRB (5,6-dichloro-1-B-D-ribofuranosylbenzimidazole) (10 μ M), ont été incubés pendant 30 minutes avec les cellules 293LT1 avant d'ajouter l'agoniste.

Différents inhibiteurs des protéines kinases A et C ont été investigués sur l'internalisation du récepteur CysLT1. Le H89 (10 μ M), un inhibiteur de PKA, a été préincubé pendant 1 heure avec les cellules. Un inhibiteur général de PKC soit le GF109203X (2 μ M), un inhibiteur des PKC classiques, le Go6976 (300 nM) ainsi qu'un inhibiteur spécifique de PKC δ , la rottlerin (10 μ M) ont également été testés et préincubés pendant 1 heure.

Les bloqueurs de la voie dépendante des vésicules de clathrine qui ont été utilisés sont le sucrose (0.45 M et 0.225 M) et la concanavaline A (0.25 mg/ml, 0.0625 mg/ml et 0.0125

mg/ml). Ces inhibiteurs chimiques ont été préincubés avec les cellules pour une durée de 20 minutes pour le sucrose ainsi que la concanavaline A.

Les agents qui perturbent la distribution membranaire en cholestérol qui ont été étudiés sont la méthyl- β -cyclodextrine (10 mM), la filipine (5 μ g/ml) et le nystatin (50 μ g/ml et 5 μ g/ml). La durée d'incubation de tous ces bloqueurs a été de 1 heure. Un inhibiteur des tyrosines kinases qui empêche la phosphorylation de la cavéoline-1, soit la génistéine (30 μ M et 200 μ M), a été également investigué.

Les agents de dépolymérisation de l'actine ont été préincubés avec les cellules pendant 1 heure pour la latrunculine B (5 μ g/ml, 1 μ g/ml) et 20 minutes pour la cytochalasine D (2 μ M et 0.2 μ M). Un agent bloqueur de la polymérisation des microtubules a également été étudié, soit la colchicine. Cet agent utilisé à une concentration de 20 μ g/ml a été préincubé pendant 30 minutes.

3.7 ÉTUDE DE L'INTERNALISATION PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX

Les cellules sont amenées à confluence dans des plaques à 6 puits. Si un antagoniste ou agent bloqueur doit être étudié, celui-ci est incubé pendant le temps recommandé avant d'être mis en présence de l'agoniste. Les agonistes privilégiés pour les récepteurs CysLT1 et CysLT2 sont respectivement le LTD₄ et le LTC₄ à une concentration de 100 nM. Le milieu de stimulation est constitué de milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) riche en glucose, 15 mM HEPES et 0.1% BSA. L'agoniste ainsi l'EtOH sont incubés aux cellules pour la durée déterminée. La stimulation est arrêtée sur glace et

toutes les autres étapes jusqu'à la lecture au FACScan sont réalisées sur la glace. Ensuite, un lavage avec du PBS froid est effectué. Les cellules sont resuspendues dans du PBS (dans des tubes de 1.5 ml) et sont centrifugées à 6000 rpm, à 4°C, pendant 2 minutes. La prochaine étape est l'incubation pendant 30 minutes du culot de cellules avec soit le surnageant d'hybridome anti-c-Myc dilué 1/2 dans PBS 2% BSA ou seulement la solution PBS 2% BSA (contrôle sans anticorps primaire). Le contrôle sans anticorps primaire doit être effectué pour chaque condition de stimulation (EtOH et agoniste) pour permettre le calcul de l'internalisation. Le surnageant d'hybridome anti-c-Myc reconnaît l'étiquette Myc en N-terminal des récepteurs CysLT1 et CysLT2. Les cellules préalablement marquées avec le surnageant d'hybridome anti-c-Myc sont lavées au PBS, centrifugées à 6000 rpm et incubées avec l'anticorps secondaire à la noirceur pendant 30 minutes. L'anticorps secondaire utilisé est l'anticorps chèvre anti-souris couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC), dilué 1 :1000 dans PBS 2% BSA. Après l'incubation de 30 minutes, les cellules sont lavées au PBS, centrifugées et resuspendues dans 200 μ l de PBS. Les échantillons sont analysés par cytométrie de flux avec le logiciel CellQuestPro via un FACScan Becton Dickinson (BD Bioscience, San Jose, Californie). Les résultats sont analysés tel que décrit dans la section 3.9.

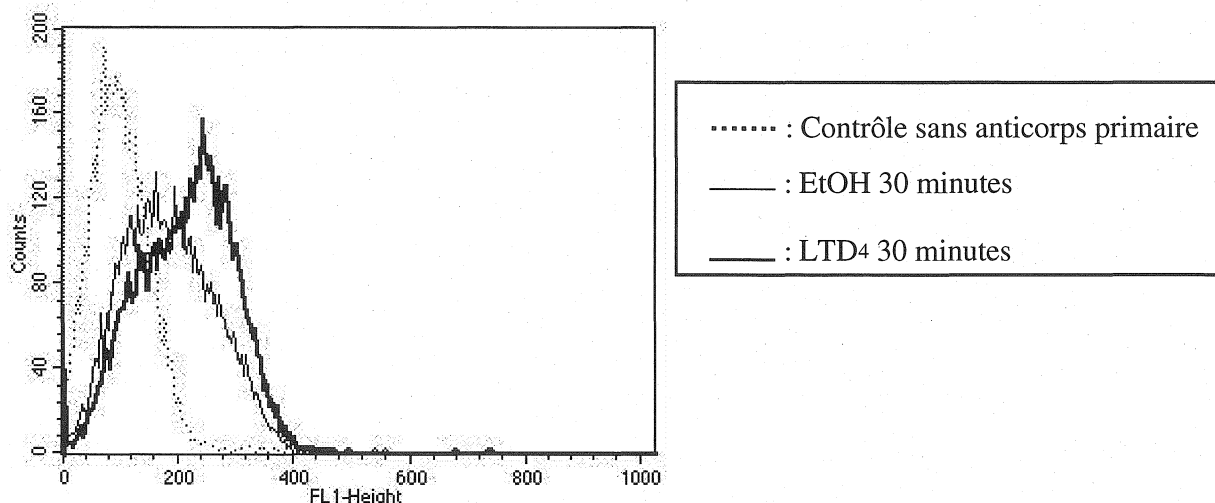


Figure 12. Exemple de résultat d'internalisation obtenu par cytométrie de flux. Les cellules ont été stimulées avec l'EtOH ou 100 nM LTD₄ pendant 30 minutes. Le déplacement de la courbe en gras vers la gauche, représenté par la courbe lisse, illustre la perte de la fluorescence à la surface des cellules soit l'internalisation des récepteurs CysLT1.

L'étude de l'expression totale des récepteurs CysLT1 et CysLT2 s'effectue tel que décrit précédemment à quelques exceptions près. Dans ce cas, la stimulation est également arrêtée sur glace mais les cellules sont ensuite fixées via un traitement de 20 minutes à la paraformaldéhyde 2% dilué dans la solution PBS. Cette fixation est nécessaire pour l'étape subséquente de perméabilisation. Afin de perméabiliser la membrane plasmique des cellules, la saponine 0.1% est incubée pendant 15 minutes aux cellules.

3.8 ANALYSE QUANTITATIVE DE L'INTERNALISATION

Le pourcentage d'internalisation du récepteur est déterminé par la quantification de la perte de récepteurs à la surface cellulaire après la stimulation avec l'agoniste (voir un exemple représentatif à la Figure 13). Le pourcentage d'internalisation a été basé sur les

données de fluorescence acquises au FACScan ou les données d'absorbance obtenues via la quantification du marquage à la surface cellulaire par ELISA.

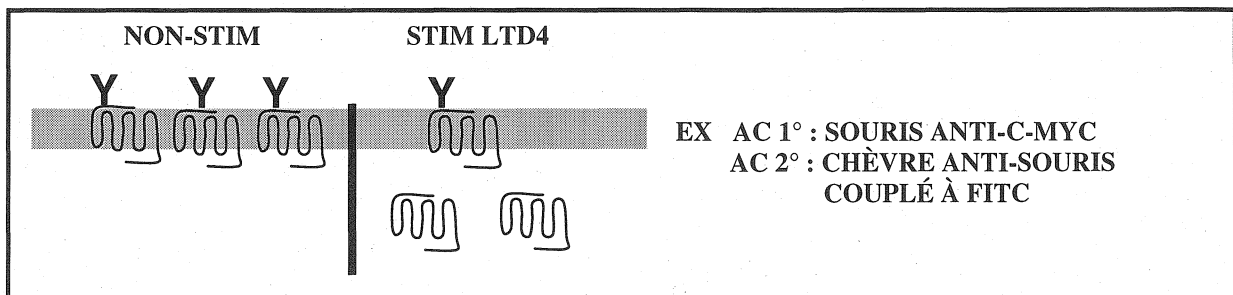


Figure 13. Schéma représentatif de l'internalisation des récepteurs après stimulation avec le ligand. Les Y illustrent les anticorps qui reconnaissent les récepteurs en N-terminal de la cellule permettant ainsi de quantifier la perte de récepteurs à la surface cellulaire.

Voici un exemple de calcul de données de FACScan :

Moyenne de fluorescence stimulé EtOH (Ac 1 et 2) – Moyenne de fluorescence stimulé EtOH (Ac 2) = A

Moyenne de fluorescence stimulé LTD₄ (Ac 1 et 2) – Moyenne de fluorescence stimulé LTD₄ (Ac 2) = B

$$\frac{(A-B)}{A} \times 100$$

3.9 IMMUNOFLUORESCENCE

Les cellules sont cultivées sur des lamelles prétraitées à la gélatine 0.2%. Pour certaines expériences, les cellules sont transfectées à 50% confluence avec le FuGENE 6, 24 heures avant l'expérience. S'il s'agit d'expériences avec des agents bloqueurs, ceux-ci sont mis en présence des cellules pour le temps recommandé avant la stimulation avec l'agoniste (voir section 3.7). Les cellules sont stimulées avec leur ligand respectif dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) riche en glucose, 15 mM HEPES et 0.1%

BSA. Les récepteurs CysLT1 et CysLT2 sont stimulés, à 37°C, respectivement avec 100 nM de LTD₄ ou LTC₄ respectivement. Après la stimulation, le milieu est retiré et les cellules sont fixées, TP, pendant 15 minutes, en présence de paraformaldéhyde 2% dilué dans du PBS. Ensuite, les cellules sont perméabilisées au triton 0.1%, pendant 20 minutes, TP, permettant ainsi de perméabiliser la membrane plasmique et le noyau. L'étape subséquente de blocage dure 15 minutes avec une solution 5% lait dans du PBS. Pour diminuer la fluorescence non-spécifique en arrière-plan des cellules, 0.01 M de glycine dans du PBS est ajouté aux cellules pour une durée de 15 minutes. Ensuite, les cellules sont incubées pour une durée de 1 heure avec leur(s) anticorps primaire(s) respectif(s). Les lamelles sont lavées 3 fois avec du PBS. Finalement, les cellules sont incubées 1 heure avec les anticorps secondaires déterminés (voir les prochaines sections). Tous les anticorps secondaires ont été dilués dans une solution de PBS 2% BSA.

Dans le cas où l'on étudie seulement l'internalisation des récepteurs CysLT1 et CysLT2, l'anticorps primaire est le surnageant d'hybridome anti-c-Myc dilué 1 :2 dans du PBS 2% BSA. L'anticorps secondaire et la sonde utilisés sont respectivement l'anticorps chèvre anti-souris couplé à AlexaFluor488 dilué 1 :3000 et la phalloïdine Texas-Red diluée 1 :1000.

Dans le cas des expériences avec les arrestines-GFP, les anticorps primaires et secondaires ont été respectivement l'anti-CysLT1 polyclonal C-terminal dilué 1 :1000 et l'anticorps chèvre anti-lapin couplé à TRICT dilué 1 :1000.

Les mutants d'arrestines 2 et 3, la dynamine, le dominant négatif dynamine (K44A) et la clathrine ont été marqués avec les anticorps primaires suivants : l'anticorps anti-CysLT1 polyclonal C-terminal dilué 1 :1000 ainsi que l'anticorps de souris anti-arrestine 2 ou 3 dilué 1 :250 ou l'anticorps anti-dynamine monoclonal dilué 1 :1000 ou l'anticorps anti-clathrine monoclonal dilué 1 :500. Les anticorps secondaires qui ont marqués les molécules d'intérêt sont l'anticorps chèvre anti-lapin couplé à TRICT dilué 1 :1000 et l'anticorps chèvre anti-souris couplé à l'AlexaFluor 488 dilué 1 :3000.

En présence de cotransfections dans les cellules 293LT1 avec les dominants négatifs de GRK, les anticorps primaires utilisés sont le surnageant d'hybridome anti-c-Myc dilué 1 :2 dans PBS 2% BSA et les anticorps anti-GRK polyclonaux respectifs dilués 1 :250. Les anticorps secondaires utilisés sont l'anticorps chèvre anti-souris couplé à l'AlexaFluor 488 ainsi que l'anticorps chèvre anti-lapin couplé à TRICT dilué 1 :1000.

Les lamelles sont lavées 3 fois avec du PBS. Ensuite, les lamelles sont incubées pendant 5 minutes avec 100 µl de To-Pro-3 iodide dilué 1 :1000 dans PBS pour la visualisation du noyau en microscopie confocale. Finalement, les lamelles sont lavées 3 fois avec du PBS avant d'être montées avec le milieu de montage Vectashield sur des lames de microscope. Ce milieu prévient la perte rapide de la fluorescence. Les échantillons sont conservés dans une boîte à 4°C. Le lendemain de l'expérience, une couche de vernis à ongle est appliquée sur le pourtour des lamelles. Au début du projet de maîtrise, un système scanner argon-laser confocal Molecular Dynamics Multiprobe 2001 (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA, USA) équipé d'un microscope inverse epifluorescence

Nikon Diaphot a été utilisé pour examiner les cellules (Figure 15). L'analyse des images a été faite à partir de la station de travail Silicon Graphics Indy 4000 (SGI, Mountain View, CA) équipé du logiciel d'analyse Imagespace. Or, le microscope confocal Olympus FluoView FV1000 et le logiciel d'acquisition Olympus Fluoview Ver.1.5 (Markham, Ontario, Canada) ont été adoptés pour toutes les autres expériences d'immunofluorescence réalisées dans le cadre de ma maîtrise (Figures 16, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 27 et 28). Les microphotographies sont capturées par des objectifs d'immersion à l'huile à 40X ou 63X et les images ont été traitées et superposées avec le logiciel Adobe Photoshop.

3.10 ESSAIS D'INOSITOL PHOSPHATES

Les cellules stables à étudier (293LT1 ou 293LT2) sont amenées à confluence dans des plaques à 6 puits. Lorsque arrivées à confluence, les cellules sont privées de sérum (milieu avec 0.2% FBS) et mis en présence de 3 µl/puit de [³H]myo-inositol dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) sans inositol. Le jour suivant, le milieu radioactif est remplacé par 570 µl de milieu DMEM sans inositol, 15 mM HEPES, 0.1% BSA, 20 mM LiCl (lithium) et les plaques sont incubées à 37°C, pendant 10 minutes. Le lithium inhibe l'enzyme inositol monophosphatase et empêche la dégradation enzymatique de l'inositol triphosphates (IP₃) en inositol (Einat et al, 1998). Ensuite, 30 µl d'agoniste concentré soit 2 µM (LTC₄ ou LTD₄) est ajouté et les plaques sont retournées à 37°C pour la durée déterminée. L'activation de la cellule va induire l'hydrolyse du phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphates (PIP₂) en 1,4,5-trisphosphate (IP₃) et

diacylglycérol (DAG) amenant une libération de Ca^{2+} et l'activation des protéines kinases C.

Cependant, certaines expériences réalisées avec les cellules 293LT2 se sont déroulées autrement. Le lendemain de l'ajout de $[^3\text{H}]\text{myo}$ -inositol, les cellules sont stimulées pour une durée de 2 à 4 heures avec le milieu seulement, l'EtOH ou le LTC_4 100 nM, à 37°C , dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) sans inositol, 15 mM HEPES, 0.1% BSA en présence de 1,8 μl de $[^3\text{H}]\text{myo}$ -inositol/puit. Après la stimulation, les cellules étaient lavées de façon efficace avec du milieu DMEM additionné de 2% BSA pour éliminer l'excès de LTC_4 .

Les récepteurs sont resensibilisés pendant 110 minutes, à 37°C , dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) sans inositol, 15 mM HEPES et 0.1% BSA. Dix minutes avant la fin de l'incubation, 12 μl de LiCl 1M est ajouté à chaque puit pour une durée de 10 minutes. Après ce temps, 30 μl d'agoniste concentré, LTC_4 2 μM , est ajouté et les plaques sont retournées à 37°C , pour 45 minutes.

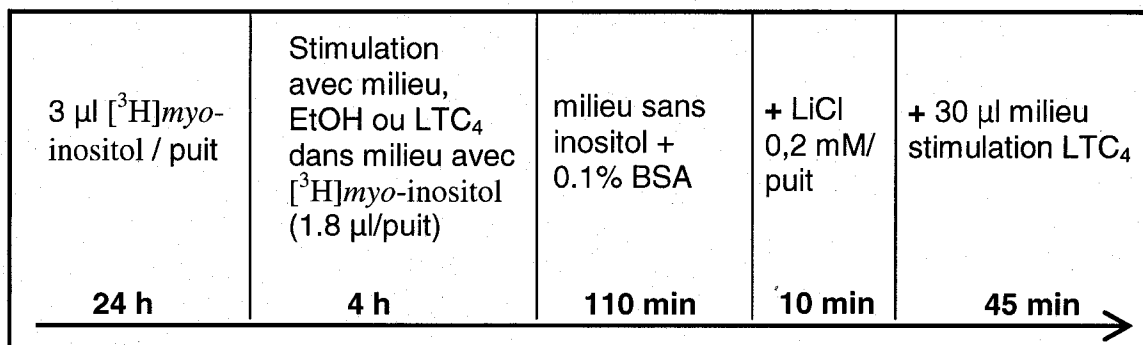


Figure 14. Schéma des étapes à suivre pour l'étude de la fonctionnalité des récepteurs CysLT2 à la surface après stimulation de 4 heures avec le ligand.

Ensuite, les plaques sont incubées sur glace et 171 µl d'acide perchlorique (PCA) 17.5% sont ajoutés à chaque puit. Après une incubation de 30 minutes sur glace, les cellules peuvent être congelées à -80°C ou sont transférées dans des tubes de 1.5 ml. Ensuite, 600 µl de 1 :1 TrichloroTrifluoroEthane/Tri-n-Octyl Amine est ajouté à chaque tube. Les tubes sont vortexés jusqu'à ce que l'on obtienne un liquide complètement jaune. Les tubes sont centrifugés 5 minutes à 14 000 rpm. Pendant ce temps, les colonnes Poly-prep sont montées sur des tubes de 50 ml et un peu d'eau est ajouté pour mouiller les membranes. Ensuite, 1 ml de suspension 50% résine Dowex AGI-X8/eau est transféré dans chaque colonne. Après que l'excès d'eau ait été drainé de la résine, la phase supérieure du lysat extrait de cellules est délicatement ajoutée sur la résine. Après que les échantillons aient traversé la colonne, 10 ml d'une solution d'ammonium formate 20 mM composé d'acide formique 0,1 N est ajouté à chaque colonne. Une fois que l'ammonium formate 20 mM a traversé la résine, les colonnes sont transférées dans des contenants à scintillation et 3 ml d'une solution d'Ammonium formate 1.5 M est ajouté à chaque colonne pour éluer les inositol phosphates totaux. Finalement, 9 ml de liquide à scintillation est ajouté à chaque contenant et la radioactivité est évaluée par scintillation liquide avec un compteur β LKB-Wallac (PerkinElmer, Wellesley, MA, USA).

3.11 ANALYSE STATISTIQUE

Afin d'évaluer si les différences sont statistiquement significatives, les données ont été traitées par un test t de Student pour des données paires via le logiciel PRISM4. Les différences étaient considérées significatives lorsque $p \leq 0.05$ pour un $n \geq 3$.

RÉSULTATS

4.1 LOCALISATION DU RÉCEPTEUR CysLT1

Tout d'abord, la localisation cellulaire du récepteur CysLT1 a été observée par immunofluorescence avant et après différents temps de stimulation avec son agoniste, le LTD₄. La lignée HEK-293 embryonnaire de rein humain exprimant de façon stable le récepteur CysLT1 (293LT1), a été le modèle cellulaire choisi pour l'étude du récepteur CysLT1 tout au long du projet. Le récepteur CysLT1 porte une étiquette c-Myc en N-terminal qui permet la quantification du niveau d'expression du récepteur CysLT1 à la surface cellulaire. La lignée 293LT1 exprime ainsi le récepteur CysLT1 à 69.8 ± 6.3 % via un marquage anti-c-Myc par cytométrie de flux (données non montrées). À l'état non-stimulé, le récepteur CysLT1 se localise de façon majoritaire à la surface cellulaire tel qu'illustré en rouge sur la Figure 15A. En présence de 100 nM LTD₄, il se produit une internalisation du récepteur à l'intérieur de la cellule. Cette entrée dans la cellule s'effectue très rapidement car après 5 minutes de stimulation (Figure 15C), le récepteur se retrouve en grande partie internalisé. Après de plus longs temps de stimulation, soit de 30 minutes (Figure 15D) et 1 heure (Figure 15E) avec le ligand, le récepteur CysLT1 est localisé dans la région péri-nucléaire. Un fait intéressant à noter est la réorganisation du cytosquelette d'actine tout au cours du processus d'internalisation avec la formation concomitante de fibres de stress d'actine. L'actine, observée en vert sur les Figures 15(A-E), est marquée par la phalloïdine, une sonde qui a une grande affinité pour la F-actine. L'organisation de l'actine débute à 1 minute de stimulation (Figure 15B), est bien

instaurée et présentes à 5 minutes de stimulation (Figure 15C) aussi bien qu'à 30 minutes et 1 heure (Figure 15D et E).

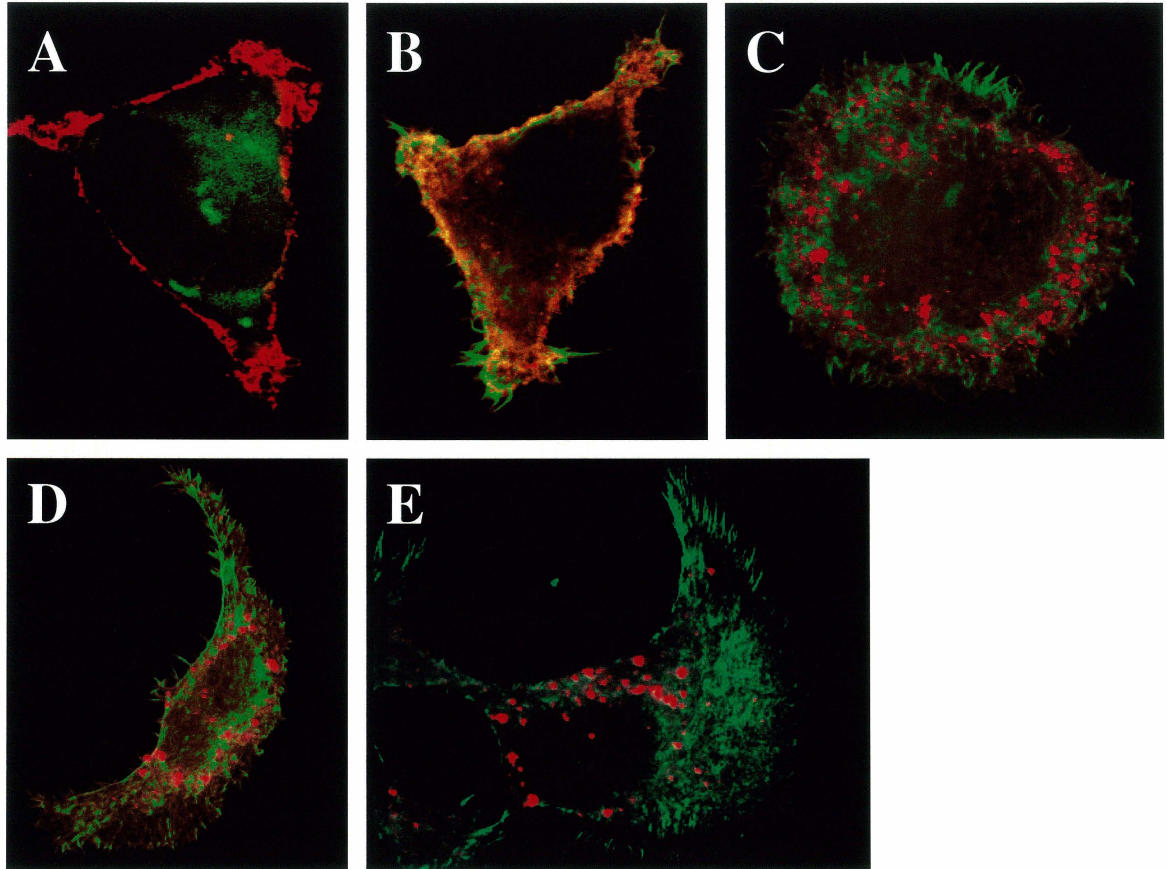


Figure 15. Localisation du récepteur CysLT1. A à E) Internalisation du récepteur CysLT1 (en rouge) pour les temps indiqués de stimulation avec 100 nM LTD₄ A) Non-stimulé B) 1 minute C) 5 minutes D) 30 minutes E) 1 heure. Le vert représente l'actine. Les cellules 293LT1 ont été fixées, perméabilisées au triton 0.1% et marquées avec l'anticorps primaire anti-c-Myc. L'anticorps secondaire utilisé est l'anticorps chèvre anti-souris couplé à AlexaFluor488. La phalloïdine Texas-Red a été utilisée pour visualiser l'actine. Les figures sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

4.2 L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT1 DÉPENDANTE DE L'AGONISTE EST SOUTENUE APRÈS DE LONGS TEMPS DE STIMULATION AVEC LE LIGAND.

L'utilisation de techniques plus quantitatives telles que la perte de fluorescence à la surface cellulaire par ELISA (Figure 16A) ou par cytométrie de flux (Figure 16B) a permis d'étudier de façon plus approfondie l'internalisation du récepteur CysLT1. L'endocytose du récepteur CysLT1 s'effectue très rapidement car déjà à 5 minutes de stimulation au LTD₄, l'internalisation du récepteur CysLT1 se chiffre à $22,8 \pm 1,6$ % par ELISA de surface cellulaire. Après 30 minutes de stimulation au LTD₄, l'internalisation du récepteur CysLT1 se situe à $53,3 \pm 2,2$ % et $47,5 \pm 2,2$ % respectivement par ELISA de surface cellulaire et cytométrie de flux. L'internalisation reste également importante et soutenue à environ 60 à 70% avec les plus longs temps de stimulation allant de 2 à 5 heures. Étant donné que les photos d'immunofluorescence semblent montrer que la quasi-totalité des récepteurs est localisée à l'intérieur de la cellule et que les techniques plus quantitatives ont montré un maximum d'internalisation à 70%, il est possible qu'une portion des récepteurs CysLT1 soit dégradée. Afin de s'assurer que l'internalisation du récepteur CysLT1 dépend de sa liaison à son agoniste, un prétraitement avec le Montelukast, un antagoniste du récepteur CysLT1, a été effectué avant la stimulation au LTD₄. Ainsi, il a été démontré par cytométrie de flux (Figure 16C) et plus visuellement par immunofluorescence (Figure 16D) que l'internalisation est significativement bloquée par un prétraitement au Montelukast ($p=0.0004$) comparativement au contrôle sans Montelukast où les récepteurs CysLT1 (en rouge, Figure 16E) internalisent normalement.

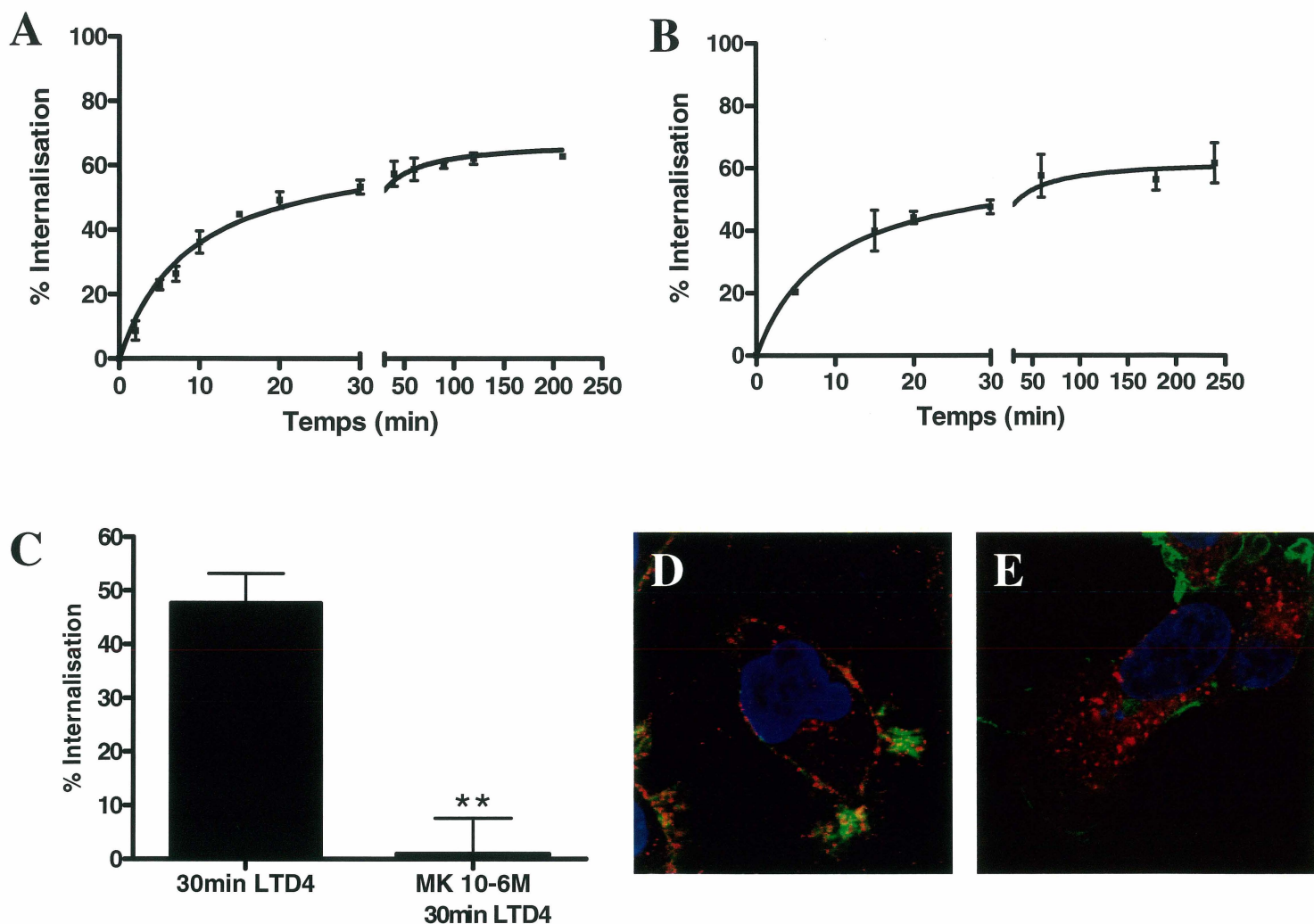


Figure 16. L'internalisation du récepteur CysLT1 dépendante de l'agoniste est soutenue après de longs temps de stimulation avec le ligand. Les cellules 293LT1 ont été stimulées, à 37°C, pour les temps indiqués de stimulation avec 100 nM LTD₄. A) L'internalisation a été déterminée par la quantification du marquage de surface par ELISA tel que décrit dans Matériel et Méthodes (n = 2 à 9). B) L'internalisation a été quantifiée par cytométrie de flux tel que décrit dans Matériel et Méthodes (n = 2 à 6). C) et D) Les cellules 293LT1 ont été prétraitées pendant 1 heure avec 1 µM Montélukast ou E) non-prétraitées et ont été stimulées 30 minutes avec 100 nM LTD₄. C) L'internalisation a été quantifiée par cytofluorométrie. Un test t (paire) de Student a été utilisé (** p=0.0004) (n=4). D) et E) Immunofluorescence sur les cellules 293LT1 avec

l'anticorps primaire anti-c-Myc. L'anticorps secondaire utilisé est l'anticorps chèvre anti-souris couplé à l'Alexa-Fluor 488. La phalloïdine Texas-Red a été utilisée pour visualiser l'actine tandis que le To-Pro-3-iodide a permis la coloration du noyau. Le rouge, le vert et le bleu représentent respectivement le récepteur CysLT1, l'actine et le noyau. Les figures sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

4.3 RÔLE DES ACIDES AMINÉS 304 À 321 DANS L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CysLT1

Plusieurs études ont démontré un rôle de la queue C-terminale dans l'internalisation de RCPG soit entre autre du récepteur BLT1, du PAFR et du TP β (Chen et al., 2002; Chen et al., 2004; Parent et al., 1999). Afin d'étudier l'implication de la portion C-terminale du récepteur CysLT1 dans son internalisation, des mutants de délétion en C-terminal du récepteur ont été construits, soit 304stop, 311stop, 321stop et 327stop (illustrés en Figure 17A). L'internalisation de ces mutants a été déterminée par la perte de fluorescence à la surface cellulaire quantifiée par cytométrie de flux (Figure 17B). Tous les mutants étaient bien exprimés dans les cellules HEK293 lorsqu'elles sont transfectés avec le FuGENE6 (données non montrées). Après 20 minutes de stimulation au LTD₄, le mutant 327stop internalise à $39,5 \pm 11,0\%$ soit de façon équivalente au récepteur CysLT1 entier qui internalise à $40,8 \pm 3,0\%$. Une baisse d'internalisation non significative à 32% est observée avec le mutant 321stop comparativement au type sauvage. Toutefois, la perte de 10 autres acides aminés (mutant 311stop) diminue de façon significative l'internalisation du récepteur en l'inhibant de 68% par rapport à celle du récepteur CysLT1 entier ($p < 0,05$). Finalement, la délétion de 7 acides aminés (304stop) empêche également l'endocytose du récepteur en la bloquant presque que complètement ($p < 0,05$). Cette

expérience démontre donc une importance capitale des acides aminés 304 à 321 pour l'internalisation du récepteur CysLT1.

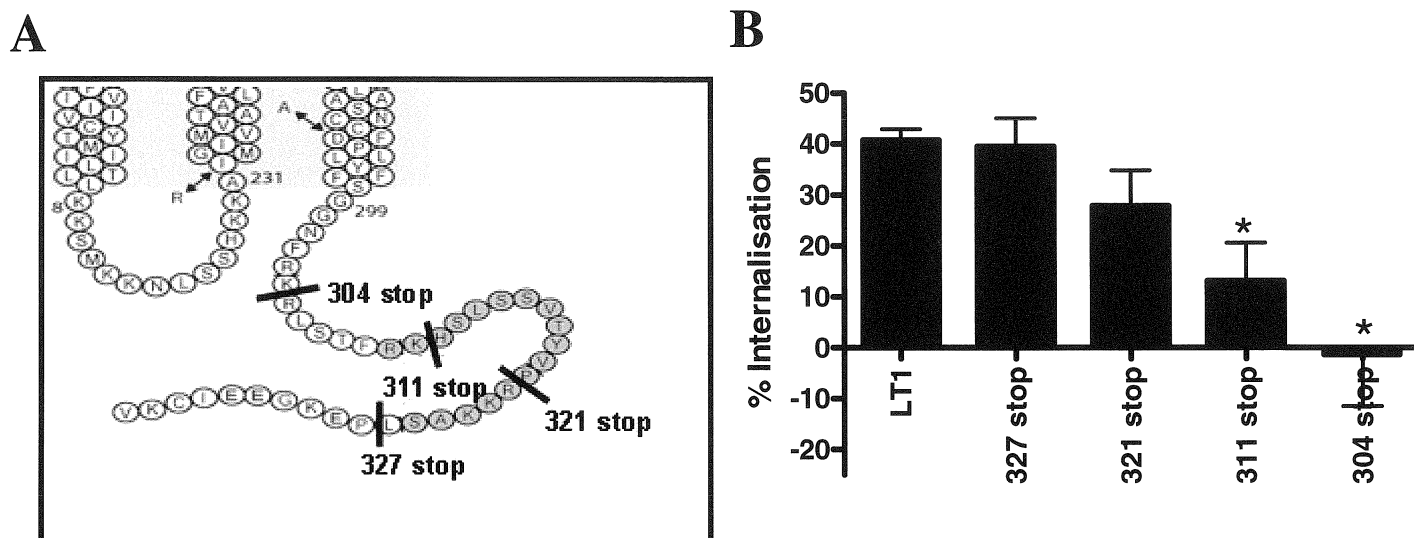


Figure 17. Rôle des acides aminés 304 à 321 dans l'internalisation du récepteur CysLT1. Les mutants du récepteur CysLT1 (schématisés ci-dessus) ainsi que le récepteur CysLT1 complet, portant une étiquette c-Myc en N-terminal, ont été transfectés de façon transitoire dans des cellules HEK293. Les cellules ont été stimulées pendant 20 minutes avec 100 nM LTD₄. L'internalisation du récepteur a été quantifiée via une analyse de la fluorescence à la surface des cellules par cytométrie de flux tel que décrit dans Matériel et Méthodes. Une analyse statistique a été effectuée soit un test t (paire) de Student (* p<0.05) (n=4).

4.4 ÉTUDE DE L'IMPLICATION DES KINASES DES RCPG (GRK) DANS L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT1

Les GRK sont des molécules qui sont notamment impliquées dans la phosphorylation du récepteur permettant le recrutement efficace des arrestines. Il a été démontré que certains RCPG nécessitent la présence de certains GRK pour permettre leur internalisation (Chen et al., 2004; Ito et al., 1999; Lazari et al., 1999; Parent et al., 1999; Vaughan et al., 2006). C'est le cas notamment de la GRK 2 qui est requise pour l'internalisation du récepteur BLT1 (Chen et al., 2004). Nous avons étudié l'importance des GRK dans l'internalisation du récepteur CysLT1 par immunofluorescence. Les dominants négatifs GRK2 (K220R), GRK5 (K215R) et GRK6 (K215R) ont été utilisés. Ces mutants de substitution ont été cotransfectés avec FuGENE6 dans les cellules 293LT1. L'immunofluorescence montre que le récepteur CysLT1, représenté en rouge (Figure 18), internalise à l'intérieur de la cellule après une stimulation de 15 minutes avec le LTD₄ malgré la présence des mutants de GRK. Les mutants GRK 5 et 6 (en vert) sont exprimés à la surface cellulaire tandis que l'expression de la GRK2 est diffuse dans la cellule. La GRK2 se lie à la membrane via la sous-unité G $\beta\gamma$ (Penn et al., 2000). Il est donc normal de voir une localisation intracellulaire de la GRK2 après 15 minutes de stimulation étant donné que la sous-unité G $\beta\gamma$ s'est détachée de la membrane et est à présent à l'intérieur de la cellule. Or, la GRK6 peut subir une modification post-traductionnelle en C-terminal qui lui confère un ancrage direct à la membrane (Krupnick and Benovic, 1998; Penn et al., 2000). Toutefois, l'expression membranaire de la GRK5 s'explique par des interactions électrostatiques entre son domaine très basique et la membrane (Ferguson et al., 1996). En résumé, les résultats obtenus avec les mutants de GRK suggèrent que dans le cas du

récepteur CysLT1, l'activité kinase des GRK2, 5 et 6 ne semble pas nécessaire pour permettre l'internalisation du récepteur CysLT1.

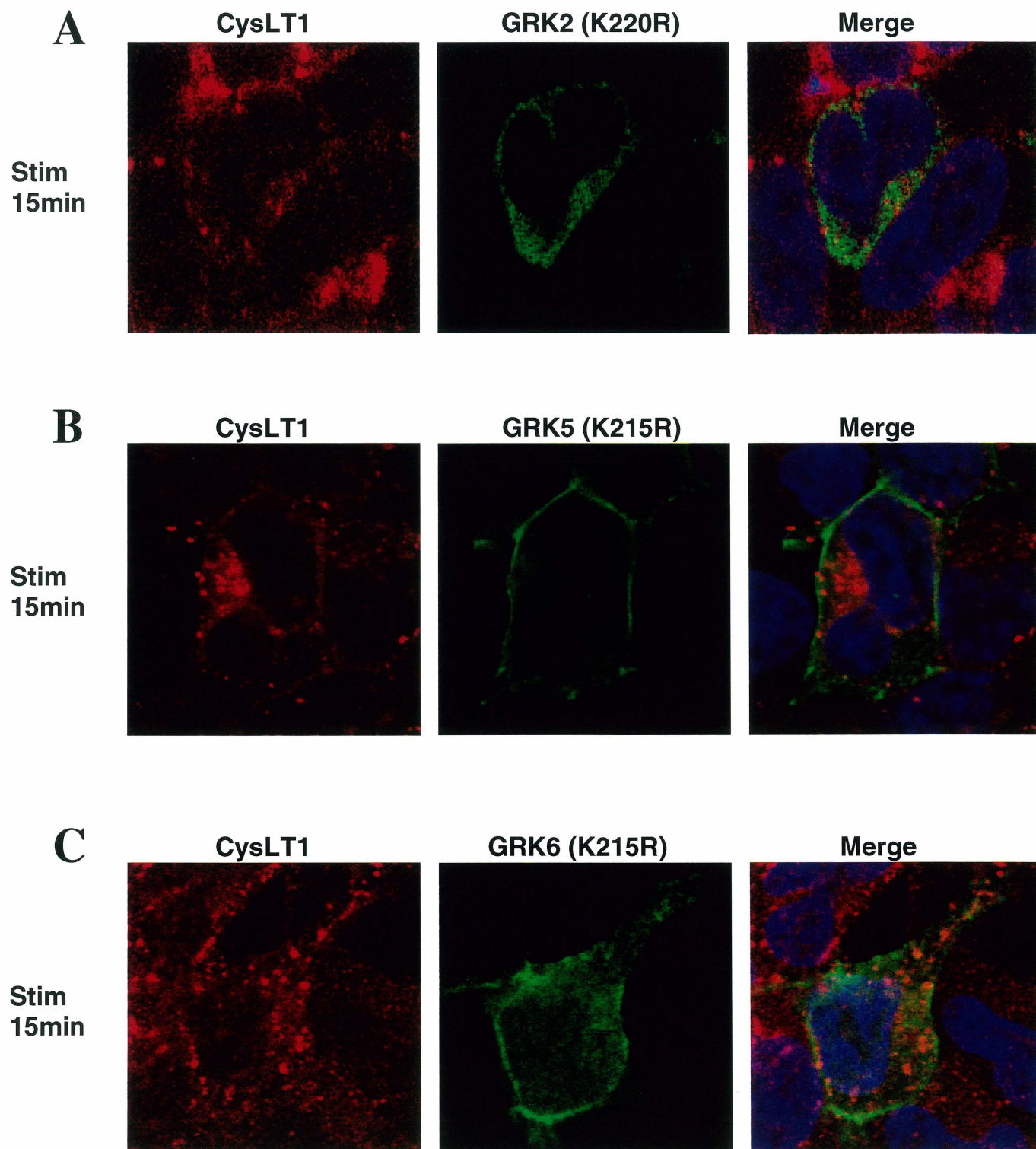


Figure 18. Les GRK 2, 5 et 6 ne semblent pas impliqués dans l'internalisation du récepteur CysLT1. Les cellules 293LT1 ont été cotransfectées avec les mutants dominants négatifs des GRK A) GRK2 (K220R) B) GRK5 (K215R) C) GRK6 (K215R). Les cellules ont été stimulées pendant 15 minutes avec 100 nM LTD₄ et ont été fixées à la paraformaldéhyde ainsi que perméabilisées au triton. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-c-Myc ainsi que les anticorps anti-GRK respectifs et par la suite avec les anticorps secondaires suivants : l'anticorps chèvre anti-souris couplé à AlexaFluor 488 ainsi que l'anticorps chèvre anti-lapin couplé à TRICT. La fluorescence des cellules a été observée par microscopie confocale. Le rouge représente le CysLT1 tandis que le vert illustre les cotransfections avec les GRK. Le noyau visualisé en bleu sur les photos a été coloré par le To-Pro-3-iodide. Non-stim : non stimulé, Stim : stimulation au LTD₄. Les figures sont représentatives de 2 expériences indépendantes.

4.5 IMPLICATION DE LA CASÉINE KINASE 1 DANS L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CysLT1

Différentes études ont révélé l'existence d'une voie alternative à la phosphorylation des RCPG par les GRK soit la phosphorylation du récepteur par les caséines kinases 1 et 2. Par exemple, il a été démontré pour les récepteurs muscariniques M1 et M3 que la caséine kinase 1 α agit comme une GRK (Budd et al., 2000; Tobin et al., 1997). Un autre groupe de recherche a montré que la phosphorylation des sites caséines kinases 2 contenus dans le récepteur à hormone de libération de la thyrotropine était nécessaire pour assurer l'internalisation dépendante des arrestines de ce récepteur (Hanyaloglu et al., 2001). De plus, le récepteur CysLT1 possède un site potentiel de phosphorylation par la caséine kinase 1 α de type II S/T(P)X_nS/T (n = 1 à 3) soit SLSSVT (313 à 318) ainsi que par la caséine kinase 2 S/TXXE soit SLPE (326 à 329) (Lynch et al., 1999; Meggio and Pinna, 2003; Tobin, 2002). Le prochain objectif a été d'étudier l'implication des 2 types de caséines kinases soit les caséines kinases 1 et 2 dans l'internalisation du récepteur CysLT1 via des agents bloqueurs de ces deux molécules soit respectivement le CK1-7 et le DRB (5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole). Les résultats obtenus en Figure 19 montrent que l'internalisation du récepteur CysLT1 est diminuée de façon significative par un prétraitement avec l'inhibiteur de la caséine kinase 1, le CK1-7, soit de 37% par rapport au contrôle non-prétraité (p=0,039). Toutefois, le prétraitement avec l'inhibiteur de caséine kinase 2, le DRB, n'affecte pas l'internalisation du récepteur CysLT1. Ces expériences suggèrent que la caséine kinase 1, impliquée notamment au niveau de la désensibilisation homologue des récepteurs, serait en partie nécessaire pour l'internalisation du récepteur CysLT1.

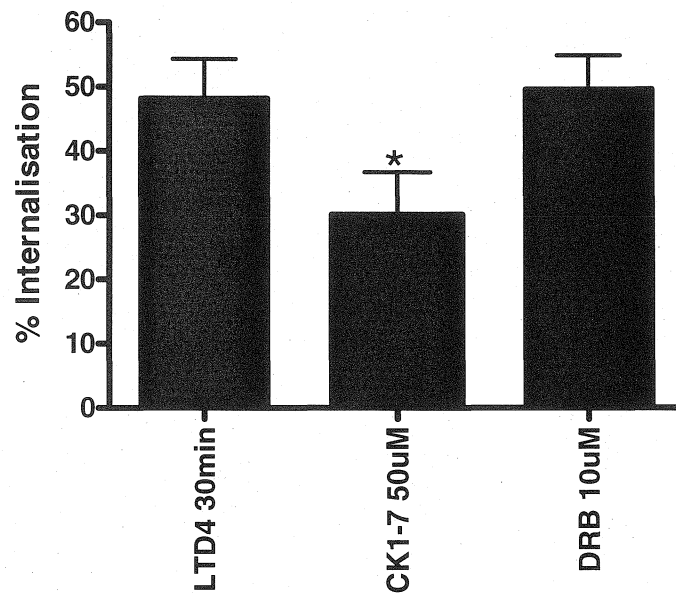


Figure 19. Implication de la caséine kinase 1 dans l'internalisation du récepteur CysLT1. Les cellules 293LT1 ont été prétraitées 30 minutes avec deux inhibiteurs des caséines kinases 1 et 2 respectivement le CK1-7 (50 μ M) et le DRB (10 μ M). Les cellules ont été stimulées au LTD₄ 100 nM pendant 30 minutes, à 37°C. L'internalisation du CysLT1 a été étudiée via l'analyse de la fluorescence à la surface cellulaire par cytométrie de flux tel que décrit dans Matériel et Méthodes. Une analyse statistique par un test t (paire) de Student a donné une significativité statistique de $p < 0.05$ (*) (n = 4 à 5).

4.6 IMPORTANCE DES PROTÉINES KINASES C POUR L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CysLT1

Nos travaux ont montré jusqu'à présent que seulement l'inhibiteur de la caséine kinase 1 pouvait en partie bloquer l'internalisation du récepteur CysLT1. Il existe d'autres molécules autres que les GRK et les caséines kinases qui ont le pouvoir de phosphoryler les récepteurs menant ensuite à l'internalisation du récepteur. Les protéines kinases A et C (PKA et PKC) peuvent notamment être impliquées dans la désensibilisation homologue des RCPG. La prochaine étape a été d'étudier le rôle des PKA et PKC dans l'internalisation du récepteur CysLT1. La Figure 20 montre les résultats de l'effet de différents inhibiteurs de PKC, soit GF109203X, Rottlerin et G06976 ainsi qu'un inhibiteur des PKA, H89, sur l'internalisation du récepteur CysLT1. En Figure 20, il a été démontré qu'un prétraitement au GF109203X, un inhibiteur général des PKC, a fortement bloqué l'internalisation du récepteur CysLT1 soit de 64% par rapport au contrôle sans prétraitement ($p < 0,05$). L'internalisation du récepteur CysLT1 a également été diminuée environ de moitié ($p < 0,05$) par rapport au contrôle sans prétraitement suite à une préincubation avec le G06976 (inhibiteur des PKC classiques) ou le Rottlerin (inhibiteur sélectif de PKC δ). Toutefois, un prétraitement avec H89, un inhibiteur des PKA, n'a pas du tout affecté l'internalisation du récepteur CysLT1. Ces résultats suggèrent ainsi que les PKC et, parmi elles, la PKC δ , sont impliquées dans la désensibilisation résultant en l'internalisation du récepteur CysLT1.

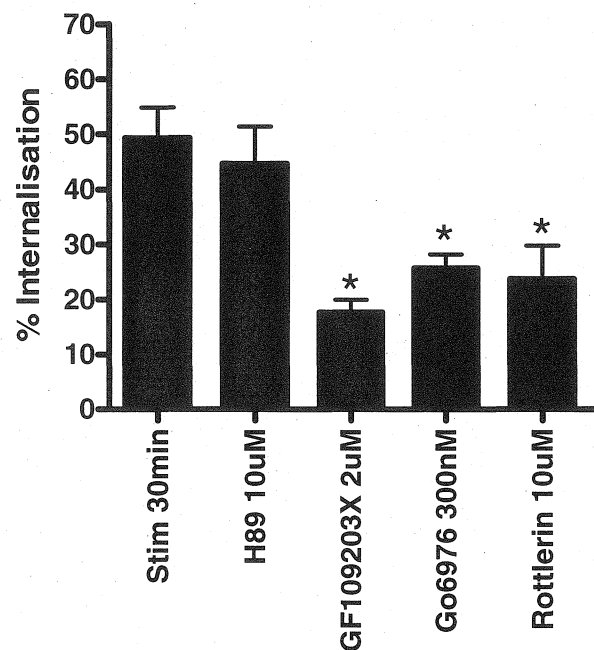
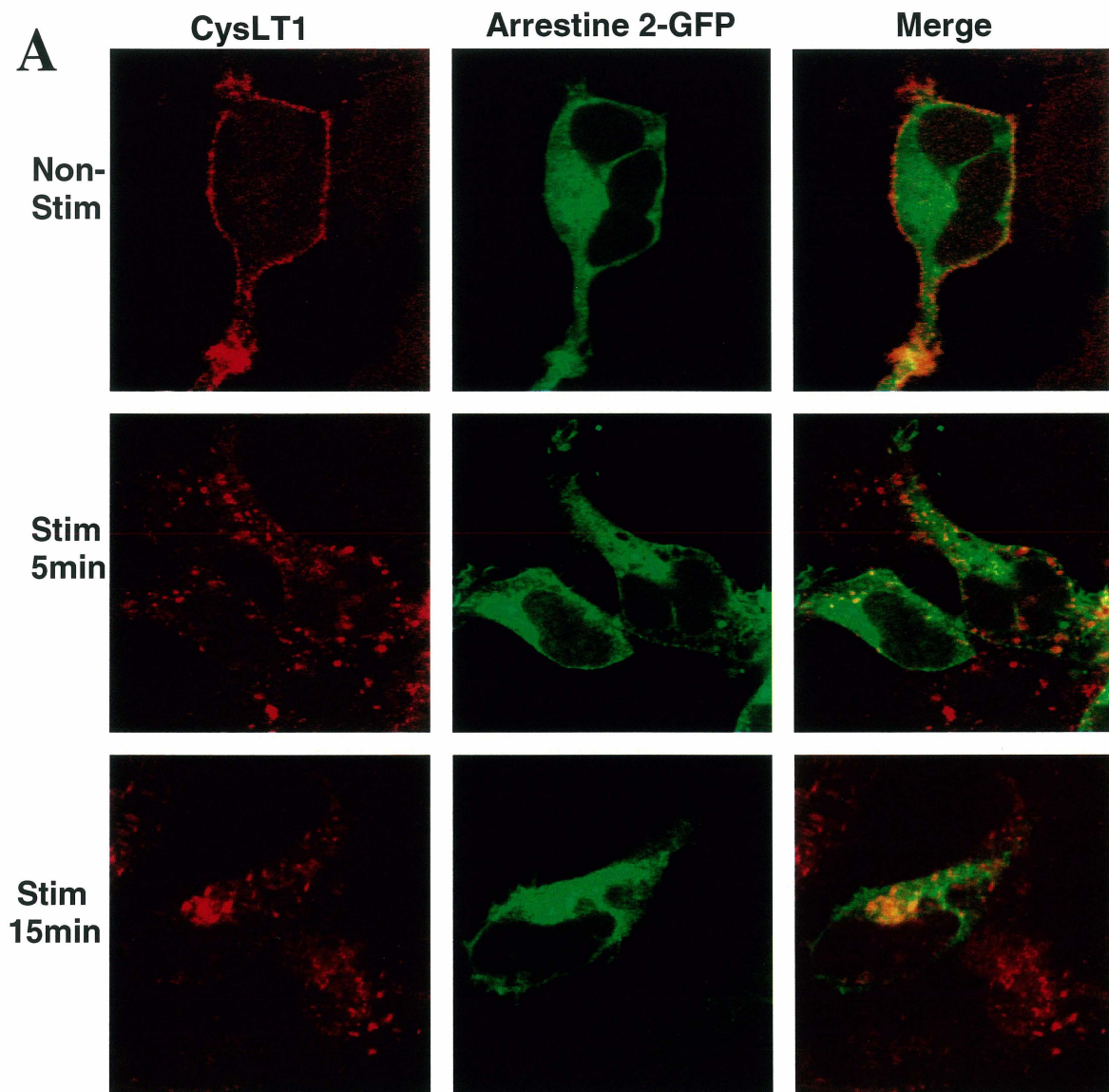


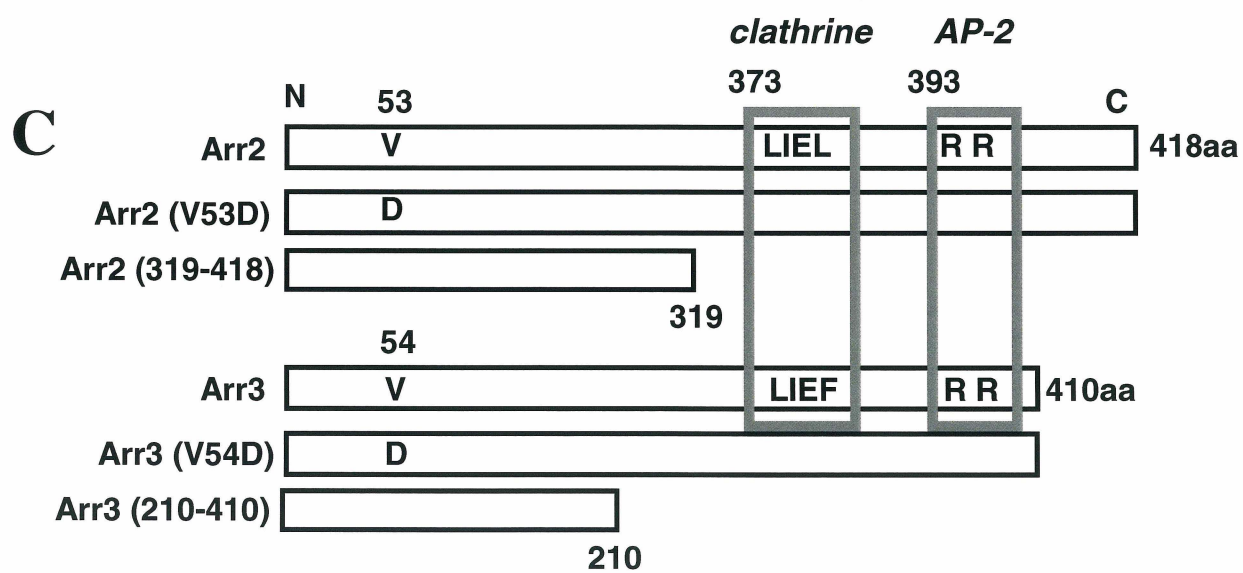
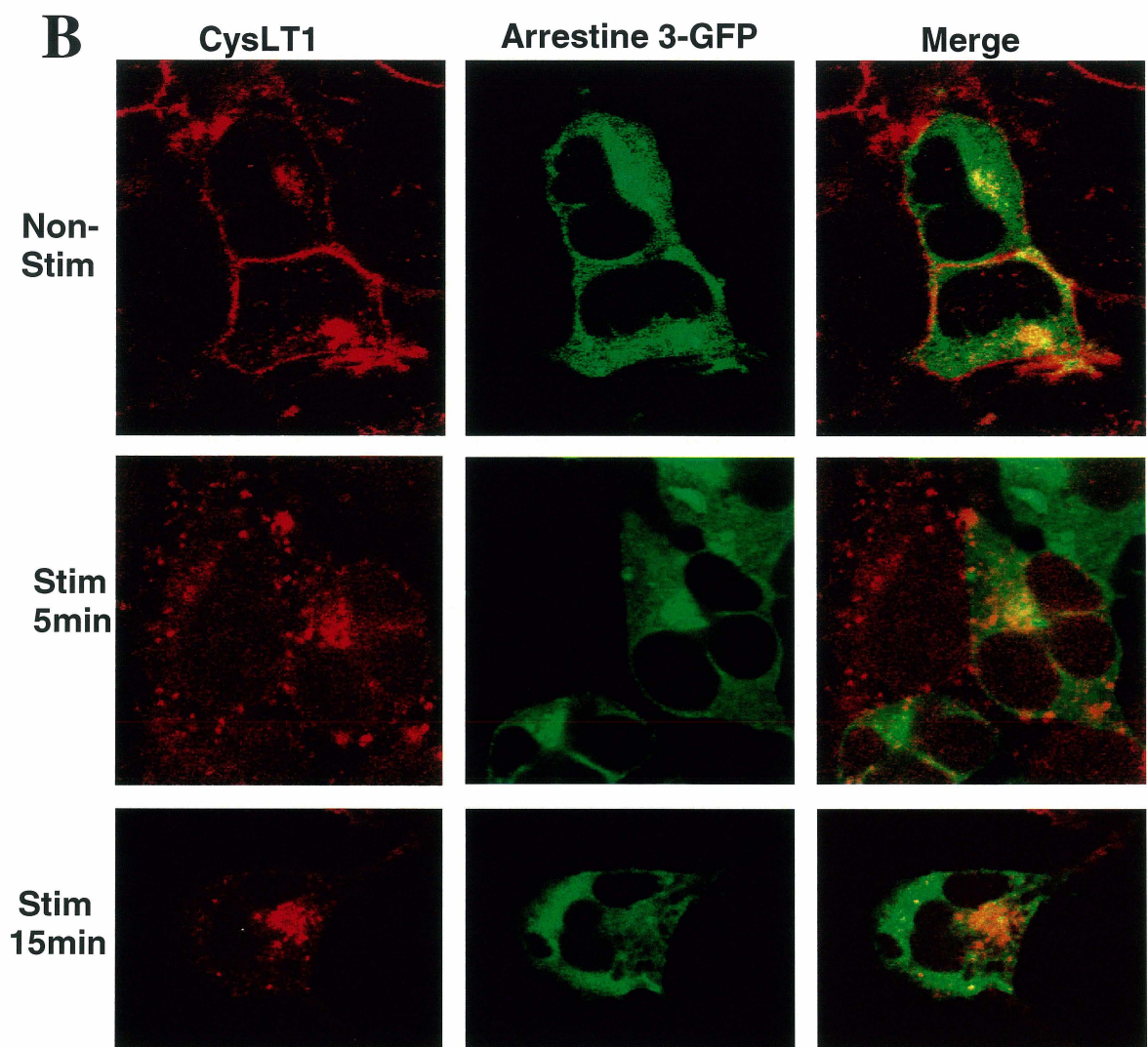
Figure 20. Importance des protéines kinases C dans l'internalisation du récepteur CysLT1. Les cellules 293LT1 ont été prétraitées pendant 1 heure avec un inhibiteur des protéines kinases A : H89 (10 μ M) ou différents inhibiteurs des protéines kinases C : GF109203X (2 μ M), Go6976 (300 nM) et Rottlerin (10 μ M). L'internalisation du CysLT1 a été étudiée via l'analyse de la fluorescence à la surface cellulaire par cytométrie de flux tel que décrit dans Matériel et Méthodes. Une analyse statistique par test t (paire) de Student a été effectuée (* $p < 0.05$) ($n=5$).

4.7 ÉTUDE DE L'IMPLICATION DES ARRESTINES 2 ET 3 DANS L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CysLT1.

Les arrestines sont notamment impliquées et recrutées lors de la 2^{ème} étape de la désensibilisation homologue des récepteurs suite à la phosphorylation des récepteurs par les GRK. Nous avons observé précédemment par immunofluorescence que plusieurs GRK ne semblent pas permettre seuls l'internalisation du récepteur CysLT1. Cette observation a mené à l'investigation de l'implication des arrestines au niveau de l'internalisation du récepteur CysLT1. L'utilisation des arrestines sauvages 2 et 3 taggés GFP ainsi que de leurs mutants Arr2 (V53D), Arr2 (318-419), Arr3 (V54D) et Arr3 (210-410) (illustrés en Figure 21C) a été d'une grande utilité pour réaliser cette étude. Les mutants Arr2 (V53D) et Arr3 (V54D) peuvent lier la clathrine mais n'interagissent pas efficacement avec les récepteurs phosphorylés tandis que ceux d'Arr2 (319-418) et Arr3 (210-410) ont subi une délétion de leur domaine de liaison à la clathrine et à AP-2 (Krupnick et al., 1997). Par immunofluorescence, il a été observé que le récepteur CysLT1 (en rouge) internalise à l'intérieur de la cellule après une stimulation de 5 et 15 minutes en cotransfection avec les arrestines sauvages (en vert) (Figure 21A et 21B). Étant donné que les arrestines 2 et 3 sont exprimées fortement et uniformément à l'intérieur de la cellule, nous remarquons après stimulation une colocalisation des arrestines 2 (Arr2) ou 3 (Arr3) avec le récepteur CysLT1. La présence des dominants négatifs d'Arr 2 (318-419), d'Arr2 (V53D) et d'Arr3 (210-410) ne semble pas avoir bloqué l'internalisation du récepteur CysLT1 (Figure 21D et E). Or, le mutant d'Arr3 (V54D) semble avoir affecté quelque peu l'internalisation du récepteur CysLT1 étant donné que les récepteurs sont localisés près de la surface cellulaire sous forme de

clusters. Ces résultats ne sont pas très concluants mais semblent suggérer que les arrestines ne sont pas impliqués l'internalisation du récepteur CysLT1.





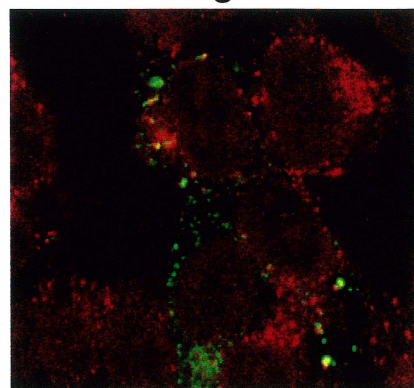
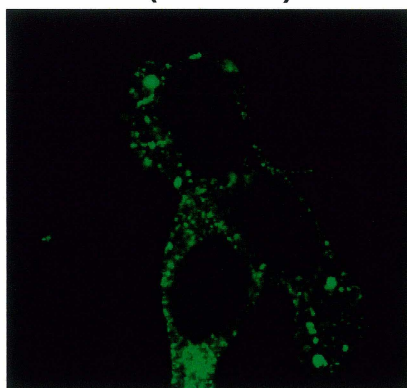
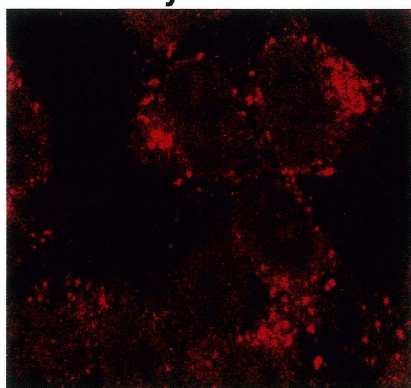
D

CysLT1

**Arrestine2
(319-418)**

Merge

**Stim
15min**

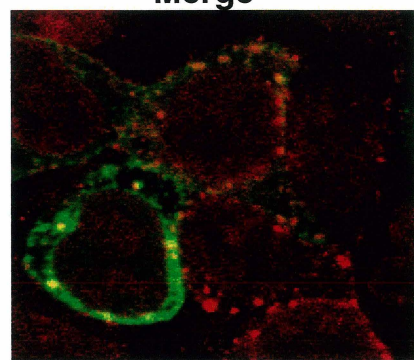
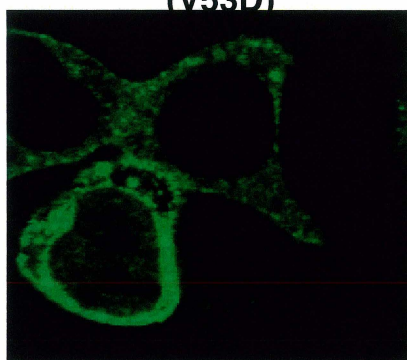
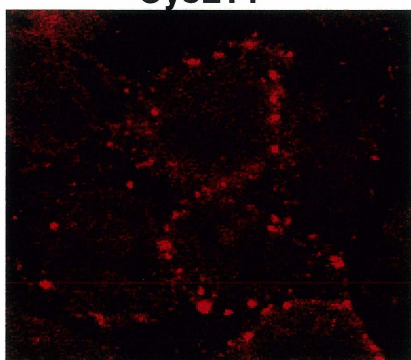


CysLT1

**Arrestine2
(V53D)**

Merge

**Stim
15min**



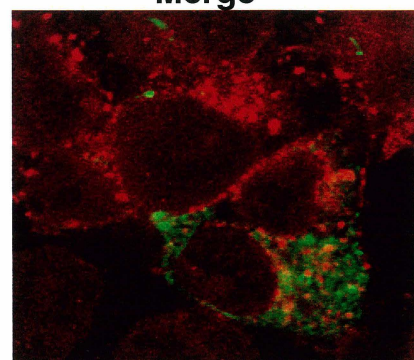
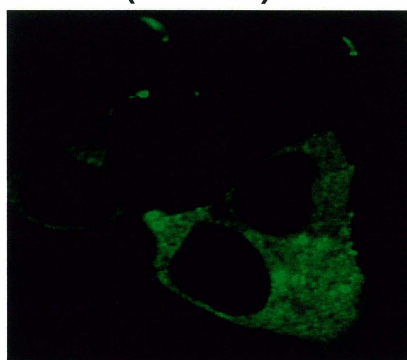
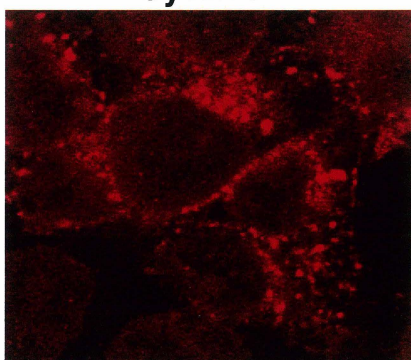
E

CysLT1

**Arrestine3
(210-410)**

Merge

**Stim
15min**



CysLT1

**Arrestine3
(V54D)**

Merge

**Stim
15min**

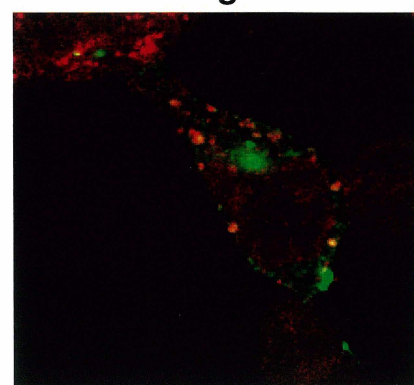
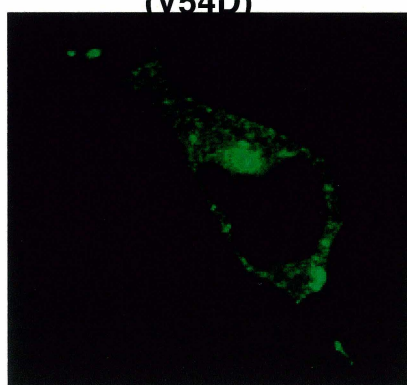
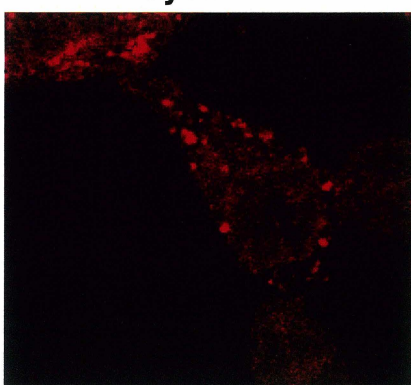


Figure 21. Étude de l'implication des arrestines 2 et 3 dans l'internalisation du récepteur CysLT1. Les cellules 293LT1 ont été cotransfectées avec les constructions suivantes d'arrestines schématisées en Figure C : A) arrestine 2-GFP B) arrestine 3-GFP D) arrestine 2 (319-418), arrestine 2 (V53D) E) arrestine 3 (210-410), arrestine 3 (V54D). Les cellules ont été stimulées au LTD₄ 100 nM pendant 5 et 15 minutes pour les arrestines GFP sauvages (en A et B) et 15 minutes pour les dominants négatifs d'arrestines (en D et E). A) et B) Les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire chèvre anti-CysLT1 C-terminal et ensuite avec l'anticorps secondaire chèvre anti-lapin couplé à TRICT. D) et E) Les cellules ont été marquées avec les anticorps primaires chèvre anti-CysLT1 C-terminal et les anticorps anti-arrestine 2 (en D) et anti-arrestine 3 (en E). Ensuite, elles ont été incubées avec les anticorps secondaires suivants : anticorps chèvre anti-lapin couplé à TRICT ainsi que l'anticorps chèvre anti-souris couplé à Alexa-Fluor 488. Finalement, la fluorescence des cellules a été observée par microscopie confocale. Le rouge représente le récepteur CysLT1 tandis que le vert illustre les arrestines GFP ou les dominants négatifs d'arrestines qui ont été cotransfectés dans les cellules. Non-stim : non stimulé, Stim : stimulation au LTD₄ 100 nM. Les figures sont représentatives de 2 à 3 expériences indépendantes.

4.8 L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT1 EST DÉPENDANTE DE LA DYNAMINE.

La dynamine est une protéine qui joue un rôle primordial dans le phénomène de scission des vésicules menant à l'internalisation des récepteurs. Elle est nécessaire pour différents types d'endocytose notamment pour l'internalisation via les vésicules de clathrine et les caveolae. La cotransfection de la dynamine 1A sauvage ou de son dominant négatif (K44A) a été investiguée dans les cellules 293LT1. En Figure 22A, en absence de stimulation, le récepteur CysLT1 (en rouge) se retrouve majoritairement à la surface cellulaire tandis que la dynamine 1A (en vert) est diffuse dans le cytoplasme. Lorsque l'on stimule les cellules pendant 30 minutes au LTD₄ 100 nM, le récepteur CysLT1 entre à l'intérieur de la cellule tandis que la dynamine ne change pas de localisation. En présence d'une cotransfection avec le dominant négatif de dynamine, le récepteur CysLT1 est aussi exprimé à la surface cellulaire en absence de stimulation tel que montré en Figure 22B. Toutefois, il est impressionnant de constater que les récepteurs CysLT1, des cellules cotransfectées avec le dominant négatif de dynamine (K44A), restent en grande partie à la surface cellulaire et ne sont donc pas internalisés. Tandis que les récepteurs CysLT1, d'une cellule voisine non-transfectée avec le dominant négatif de dynamine (K44A), internalisent normalement à l'intérieur de la cellule. Ces résultats illustrent de façon convaincante la nécessité de la dynamine 1A pour l'internalisation du récepteur CysLT1.

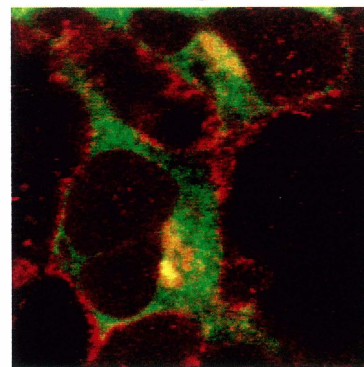
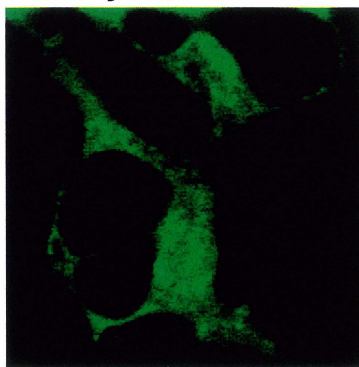
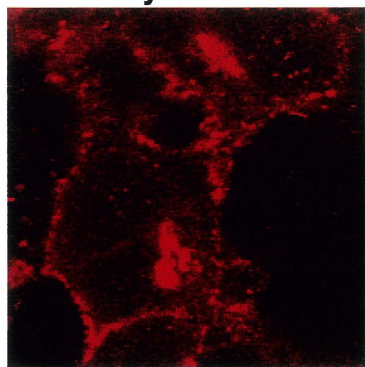
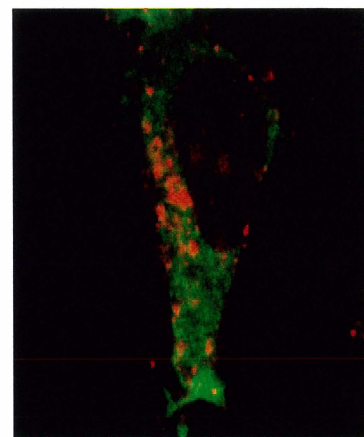
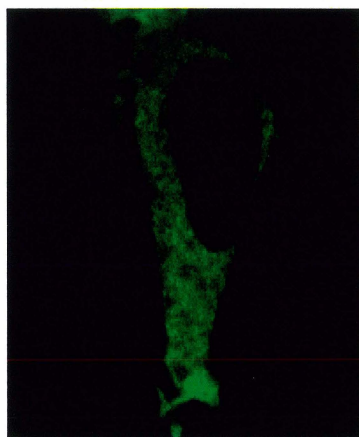
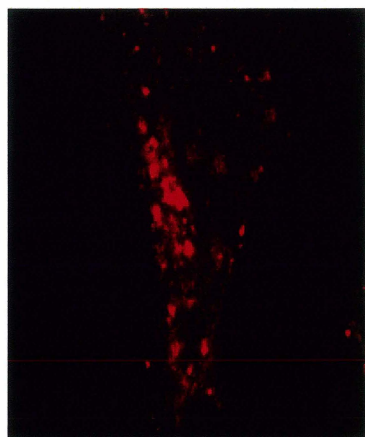
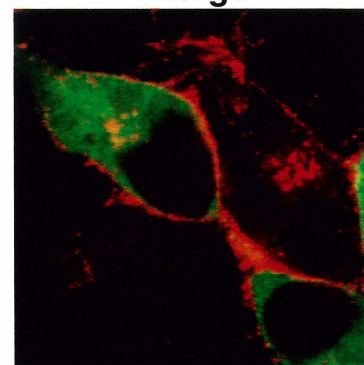
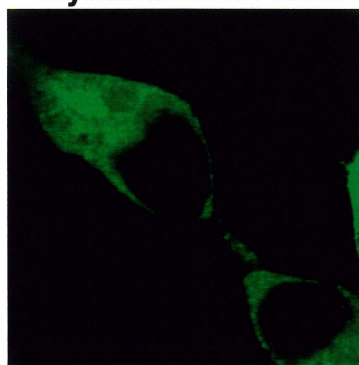
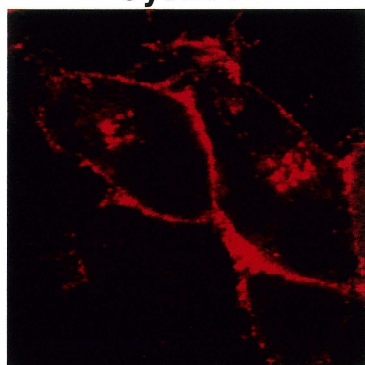
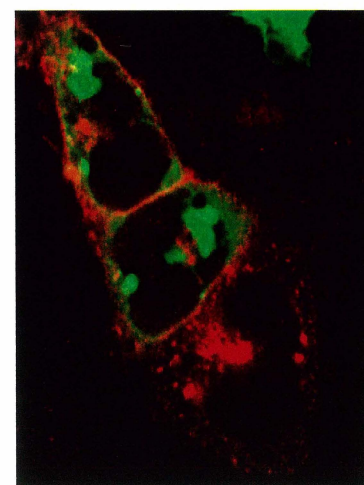
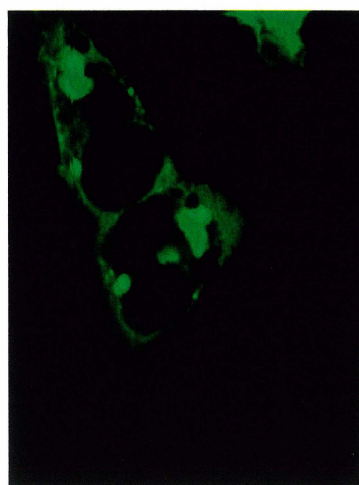
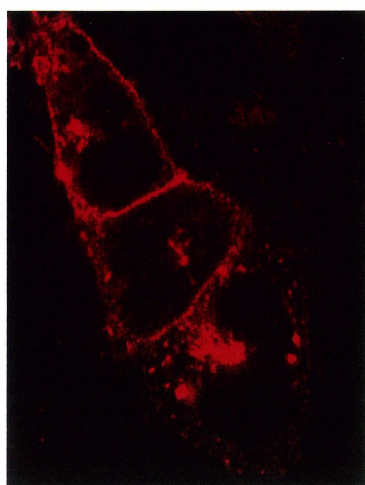
A**CysLT1****Dynamine 1A****Merge****Non-Stim****Stim 30min****B****CysLT1****Dynamine 1A K44A****Merge****Non-Stim****Stim 30min**

Figure 22. L'internalisation du récepteur CysLT1 est dépendante de la dynamine.

Les cellules 293LT1 ont été cotransfectées avec A) la dynamine 1A ou B) le dominant négatif dynamine 1A (K44A). Quarante-huit heures post-transfection, les cellules ont été stimulées 30 minutes avec 100 nM LTD₄. Les cellules 293LT1 cotransfectées de façon transitoire avec la dynamine sauvage ou le dominant négatif ont été marquées avec l'anticorps primaire chèvre anti-CysLT1 C-terminal ainsi que l'anticorps de souris anti-dynamine. Par la suite, les cellules ont été incubées avec les anticorps secondaires suivants : l'anticorps chèvre anti-lapin couplé à TRICT ainsi que l'anticorps chèvre anti-souris couplé à l'Alexa-Fluor 488. La fluorescence des cellules a été observée par microscopie confocale. Le rouge et le vert représentent respectivement le récepteur CysLT1 et la dynamine sauvage ou son dominant négatif. Non-stim : non stimulé, Stim : stimulation au LTD₄ 100 nM. Les figures sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

4.9 LE RÉCEPTEUR CysLT1 INTERNALISE VIA LA VOIE DÉPENDANTE DES VÉSICULES DE CLATHRINE

La prochaine étape du projet a été de déterminer quelles voies d'endocytose sont empruntées par le récepteur CysLT1 pour son internalisation. La première voie qui a été investiguée est la voie dépendante des vésicules de clathrine, la voie majoritairement utilisée par les RCPG. Différentes concentrations de deux agents, connus dans la littérature pour inhiber l'endocytose par cette voie, ont été utilisées, soit le sucrose (0,45 M) et la concanavaline A (0,25 mg/ml) (Chen et al., 2004; Le Gouill et al., 1997). Un prétraitement au sucrose amène un milieu hypertonique qui induit une polymérisation anormale de la clathrine et forme des microcages vides (Heuser and Anderson, 1989). La concanavaline inhibe également la séquestration des récepteurs mais par un mécanisme moins bien connu (Pippig et al., 1995). En Figure 23A, il est montré par cytofluorométrie qu'un prétraitement avec 0,45 M de sucrose bloque à 98% ($p < 0,0001$) l'internalisation du récepteur CysLT1 induite par une stimulation de 30 minutes avec 100 nM de LTD₄. Si l'on dilue de moitié la concentration de sucrose, l'internalisation des récepteurs CysLT1 n'est diminuée que faiblement et de façon non-significative ($p = 0,25$) de 23% par rapport au contrôle non-prétraité. Par ailleurs, un prétraitement avec 0,25 mg/ml de concanavaline A diminue significativement l'internalisation du récepteur CysLT1 soit de 74% ($p = 0,0018$) par rapport au contrôle non-prétraité. Même si l'on dilue la concanavaline à 0,025 mg/ml, elle conserve son effet en bloquant à 81% ($p = 0,0158$) l'internalisation des récepteurs CysLT1 comparativement aux cellules qui n'ont pas eu de prétraitement. Toutefois, lorsque la concentration de concanavaline est de 0,0025 mg/ml, l'internalisation des récepteurs est diminuée de façon non-significative ($p = 0,1564$) soit de 42% par rapport aux cellules contrôles. Ces résultats suggèrent fortement que le récepteur

CysLT1 emprunte la voie dépendante des vésicules de clathrine pour son internalisation. Afin d'étudier ces faits de façon visuelle, un essai de colocalisation du récepteur avec la clathrine a été accompli par microscopie confocale. La Figure 23B montre que le récepteur CysLT1 (en rouge) est localisé à la surface cellulaire tandis que la clathrine (en vert) est distribuée uniformément dans le cytoplasme de la cellule. Suite à une stimulation de 5 minutes au LTD₄, une colocalisation (en jaune) du récepteur CysLT1 et de la clathrine est visible à l'intérieur de la cellule plus précisément en périphérie du noyau. Nous pouvons également voir cette colocalisation sur les figures en noir et blanc où les taches blanches illustrant la colocalisation sont considérablement plus abondantes en Figure 23A qu'en Figure 23B où il n'y en a que très peu. Ces résultats suggèrent que le récepteur CysLT1 emprunte la voie dépendante des vésicules de clathrine pour son internalisation.

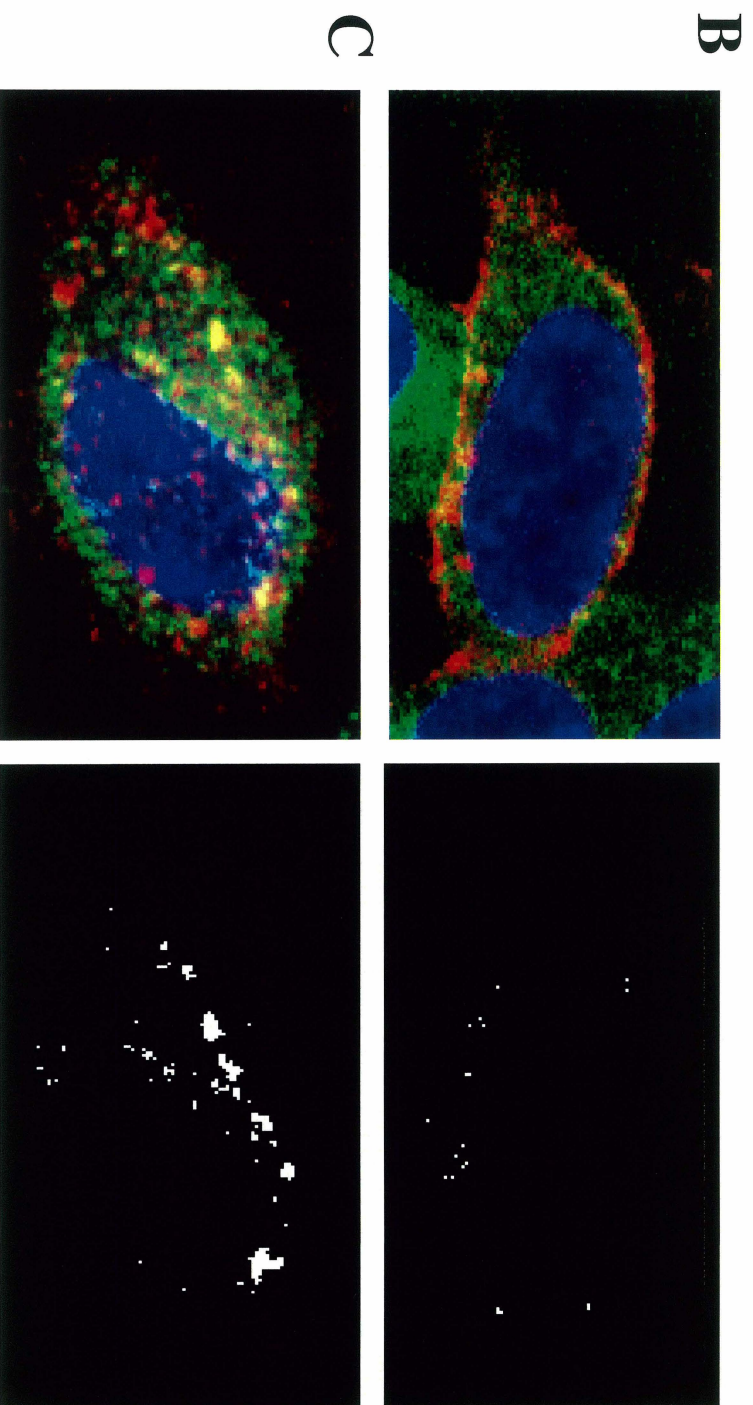
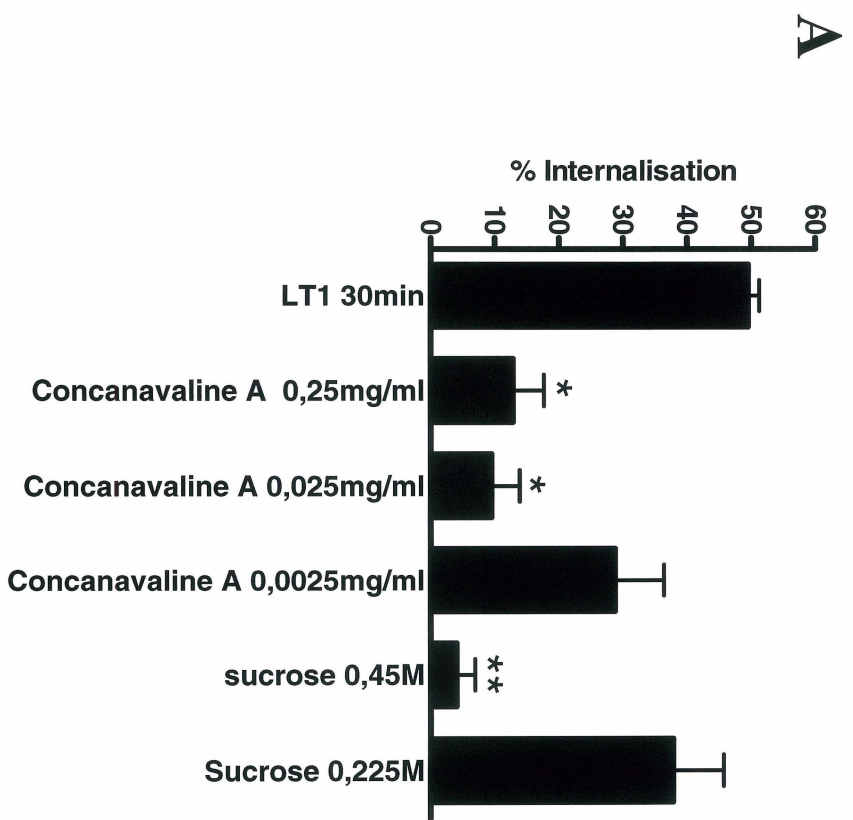


Figure 23. Le récepteur CysLT1 internalise via la voie dépendante des vésicules de clathrine. A) Les cellules 293LT1 ont été prétraitées pendant 20 minutes avec différentes concentrations de concanavaline A (0.25 mg/ml, 0.0625 mg/ml et 0.0125 mg/ml) et de sucrose (0.45 M et 0.225 M). Ensuite, les cellules ont été stimulées au LTD₄ 100 nM, pendant 30 minutes, à 37°C. L'internalisation du CysLT1 a été étudiée par cytométrie de flux tel que décrit dans Matériel et Méthodes. Une analyse statistique par tests t (paire) de Student a été réalisée (* p<0.05, ** p<0.001) (n = 3 à 6). Les cellules 293LT1 ont été B) non-stimulées ou C) stimulées pendant 5 minutes au LTD₄ 100 nM, à 37°C. Ensuite, les cellules ont été incubées avec les anticorps primaires suivants : l'anticorps chèvre anti-CysLT1 C-terminal ainsi que l'anticorps de souris anti-clathrine. Par la suite, les cellules ont été incubées avec les anticorps secondaires suivants : l'anticorps chèvre anti-lapin couplé à TRITC ainsi que l'anticorps chèvre anti-souris couplé à Alexa-Fluor 488. La fluorescence des cellules a été déterminée par microscopie confocale. Le rouge représente le CysLT1, le vert est la clathrine et le bleu est le noyau. Les figures en noir et blanc produites via le logiciel Fluoview FV1000 d'Olympus montrent en blanc la colocalisation entre la clathrine et le récepteur CysLT1. Les figures sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

4.10 L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CysLT1 EST AFFECTÉE PAR DES AGENTS QUI DÉSTABILISENT LES RADEAUX LIPIDIQUES ET LES CAVEOLAE

Certains GPCR empruntent à la fois la voie dépendante des vésicules de clathrine et celle dépendante des caveolae tels que les récepteurs $\beta 1$ adrénergiques et de l'endothéline (Roettger et al., 1995). Précédemment, nous avons démontré que le récepteur CysLT1 pouvait emprunter la voie dépendante des vésicules de clathrine pour son internalisation. Nous avons donc voulu investiguer si d'autres voies étaient empruntées pour l'internalisation du CysLT1 telles que la voie dépendante des radeaux lipidiques et des caveolae. Les radeaux lipidiques tout comme les caveolae sont des microdomaines très ordonnés constitués de phospholipides, sphingolipides et cholestérol. L'endocytose par ces microdomaines est sensible à une perturbation en cholestérol (Razani et al., 2002; Rothberg et al., 1990). Afin de démontrer l'implication des radeaux lipidiques et des caveolae dans l'internalisation du récepteur CysLT1, différents agents connus pour perturber la localisation du cholestérol de la membrane ont été utilisés. Les agents qui ont été évalués sont la filipine, le nystatin et la méthyl- β -Cyclodextrine aux concentrations utilisées dans la littérature (Anderson et al., 1996; Estall et al., 2004; Hartung et al., 2006; Pawson et al., 2003; Puri et al., 2001; Rodal et al., 1999; Schnitzer et al., 1994). La filipine, un antibiotique polyène et le nystatin ont un mécanisme d'action commun. Ils se lient au cholestérol à l'intérieur de la membrane pour former des complexes qui vont ainsi altérer la répartition du cholestérol (Lobie et al., 1999; Reungpatthanaphong et al., 2004; Rothberg et al., 1992). Or, la méthyl- β -Cyclodextrine agit en extrayant le cholestérol de la membrane plasmique (Rodal et al., 1999). Un prétraitement de 1 heure avec 10 mM méthyl- β -Cyclodextrine diminue fortement l'internalisation du récepteur

CysLT1 soit de 71% ($p=0,0083$) comparativement aux cellules contrôles non-prétraitées (Figure 24A). Cette forte inhibition est également visible par microscopie confocale où l'on peut voir sur la Figure 24B que les récepteurs CysLT1 (en rouge) restent en grande partie localisés à la membrane plasmique suite au prétraitement avec la méthyl- β -cyclodextrine et à la stimulation avec le ligand. Or, il a été démontré que cet agent n'a pas une action inhibitrice uniquement sur la voie dépendante des radeaux lipidiques et des caveolae mais qu'il pourrait également agir sur l'endocytose via les vésicules de clathrine (Rodal et al., 1999). Comme l'internalisation du récepteur CysLT1 est dépendante de la voie des vésicules de clathrine, nous ne pouvons pas discriminer quelle proportion de récepteurs est internalisée par chacune des 2 voies. Nous avons donc étudié l'effet d'un autre agent soit la filipine. Un prétraitement avec 5 μ g/ml de filipine inhibe significativement l'internalisation des récepteurs CysLT1 soit de 60% ($p<0,05$) comparativement aux cellules contrôles non-traitées (Figure 24A). Ce résultat nous amène une première évidence de la dépendance d'un domaine riche en cholestérol pour l'internalisation du récepteur CysLT1. Toutefois, un prétraitement avec le nystatin à une concentration de 25 μ g/ml, normalement utilisée dans la littérature, n'a pas diminué significativement l'internalisation du récepteur CysLT1 soit de seulement 14% par rapport aux cellules contrôles (Figure 24A). Cependant, un prétraitement avec une concentration deux fois plus élevée de nystatin soit de 50 μ g/ml, a inhibé de façon significative de 35% l'internalisation des récepteurs CysLT1 comparativement aux cellules non-prétraitées (Figure 24A). Un dernier agent a aussi été étudié qui agit sur les caveolae par un autre mécanisme que la déplétion en cholestérol. Il s'agit de la génistéine, un inhibiteur des tyrosines kinases, qui inhibe la phosphorylation de Cav-1 et

ce en n'affectant pas l'internalisation médiée via les vésicules de clathrine (Aoki et al., 1999). Un prétraitement de 1 heure avec 200 μ M de génistéine, concentration utilisée dans la littérature, a diminué de 58% ($p=0,002$) l'internalisation des récepteurs CysLT1 par rapport aux cellules non-prétraitées (Figure 24A) (Hartung et al., 2006). Or, une dilution à 30 μ M de génistéine ne bloque plus significativement l'endocytose des récepteurs CysLT1 avec diminution de 27% de celle-ci. Ces données nous indiqueraient une dépendance des caveolae pour l'internalisation du récepteur CysLT1.

Nous avons également étudié la dépendance des caveolae plus particulièrement de la cavéoline-1 pour l'internalisation du récepteur CysLT1 par immunofluorescence. Sur la Figure 24C, nous observons que le récepteur CysLT1 non-stimulé, illustré en rouge, se situe à la surface cellulaire tandis que la cavéoline-1, représentée en vert, se retrouve à l'intérieur de la cellule et ne colocalise pas avec le récepteur. La cavéoline-1 est fortement exprimée dans une région près du noyau possiblement dans le Golgi et/ou le réticulum endoplasmique, où elle est synthétisée. Les Figures 24D et E montrent la localisation du récepteur CysLT1 et de la cavéoline-1 respectivement après 5 minutes et 15 minutes de stimulation au LTD₄.

Pour le moment, ces résultats suggèrent une dépendance d'un domaine riche en cholestérol pour permettre l'internalisation du récepteur CysLT1 et par conséquent indiquent un rôle probable des radeaux lipidiques et/ou des caveolae dans l'endocytose du récepteur CysLT1. Toutefois la dépendance des caveolae pour l'internalisation du récepteur CysLT1 reste encore à être définie.

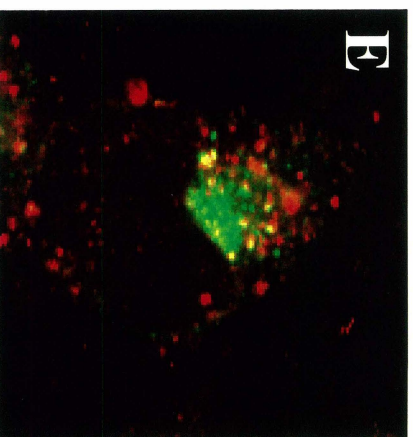
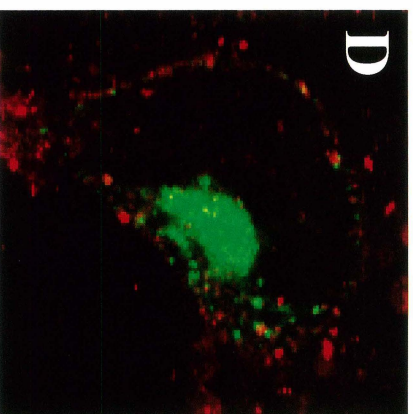
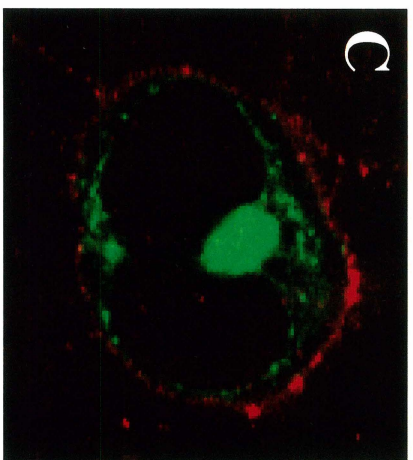
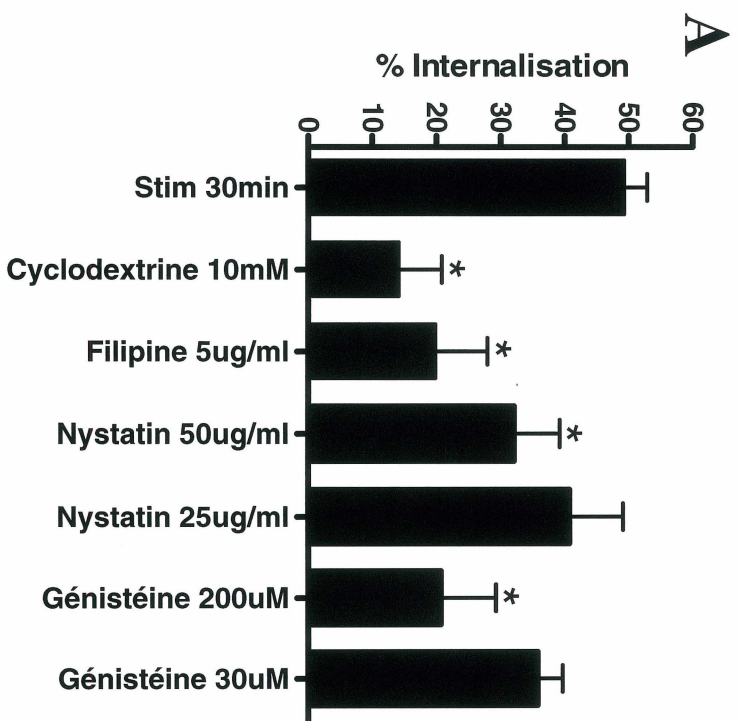


Figure 24. L'internalisation du récepteur CysLT1 est affectée par des agents qui déstabilisent les radeaux lipidiques et les caveolae. A) Les cellules 293LT1 ont été prétraitées pendant 1 heure avec différentes concentrations de nystatin (50 µg/ml et 25 µg/ml), méthyl-β-cyclodextrine (10 mM), la filipine (5 µg/ml) et la génistéine (200 µM et 30 µM). Ensuite, les cellules ont été stimulées au LTD₄ 100 nM, pendant 30 minutes, à 37°C. L'internalisation du CysLT1 a été étudiée via l'analyse de la fluorescence à la surface cellulaire par cytométrie de flux tel que décrit dans Matériel et Méthodes. Une analyse statistique a été effectuée par des tests t (paireés) de Student (* p<0.05) (n = 3 à 6). B) Les cellules 293LT1 ont subi un traitement avec 10 mM méthyl-β-cyclodextrine avant la stimulation avec l'agoniste. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire surnageant d'hybridome anti-c-Myc et par la suite avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à TRICT. La fluorescence des cellules a été observée par microscopie confocale. Le rouge et le bleu représentent respectivement le récepteur CysLT1 et le noyau. C) D) et E) Les cellules 293LT1 ont été cotransfectées avec la cavéoline-1-GFP et ont été C) non-stimulées ou stimulées D) 5 minutes E) 15 minutes avec 100 nM LTD₄. Les cellules ont été marquées avec l'anticorps surnageant d'hybridome anti-c-Myc et ensuite avec l'anticorps chèvre anti-souris couplé à TRITC. La fluorescence a été observée par microscopie confocale. Les figures sont représentatives de 2 expériences indépendantes.

4.11 UN RÉSEAU D'ACTINE INTACT EST NÉCESSAIRE POUR L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CysLT1

Il a été observé précédemment (Figure 15) par immunofluorescence qu'un réarrangement du cytosquelette d'actine est perçu après une stimulation avec le LTD₄. La question véritable est de savoir si ce réarrangement de l'actine est essentiel pour permettre l'internalisation du récepteur CysLT1. Plusieurs récepteurs ont besoin d'un réseau d'actine intact et dynamiquement fonctionnel pour assurer leur internalisation. C'est le cas notamment des récepteurs du thromboxane A₂, β -adrénergiques et P2Y₂ (Laroche et al., 2005; Tulapurkar et al., 2005; Volovyk et al., 2006).

Différents agents tels que la cytochalasine D et la latrunculine B, bien connus dans la littérature pour induire une dépolymérisation de l'actine, ont été utilisés afin de déterminer le rôle de l'actine dans l'internalisation du récepteur CysLT1 (Laroche et al., 2005; Volovyk et al., 2006). La cytochalasine D agit au niveau de l'actine en induisant une dépolymérisation plus particulièrement des fibres de stress d'actine (Pendleton et al., 2003). La latrunculine B, un autre agent qui agit sur la dépolymérisation de l'actine, a aussi été choisie. Cet agent a une action plus élargie que la cytochalasine. Tout comme la cytochalasine, la latrunculine agit sur la dépolymérisation des fibres de stress d'actine mais détient en plus un pouvoir de destruction des filaments d'actine corticaux (Gaidarov et al., 1999). Il a été démontré par le groupe de Rockman que la latrunculine B n'affecte pas la translocation des arrestines ni le recrutement de la dynamine au niveau du récepteur activé par un agoniste (Volovyk, ZM et al., 2006).

La nécessité d'un réseau d'actine intact pour permettre l'internalisation du récepteur thromboxane A₂ a été bien démontrée par le groupe de Jean-Luc Parent. Ils ont observé une inhibition de l'internalisation du récepteur thromboxane A₂ de 70% avec soit un prétraitement à la cytochalasine B (5 ug/ml) ou à la latrunculine B (2 uM) par ELISA de surface cellulaire (Laroche et al., 2005). Or, des prétraitements avec ces agents aux mêmes conditions et concentrations que ce groupe ont été réalisés sur les cellules 293LT1 préalablement stimulées 30 minutes avec le ligand LTD₄. L'analyse de l'internalisation a été effectuée par cytométrie de flux. Tel que vu en Figure 25, un prétraitement avec 2 uM de cytochalasine D a inhibé de façon significative l'internalisation des récepteurs CysLT1 soit de 57% ($p=0,0007$) par rapport aux cellules contrôles non-prétraitées. Lorsque la cytochalasine D est diluée d'un facteur de 10 soit à 0.2 uM, l'internalisation est aussi diminuée de façon significative ($p=0.039$) avec une baisse de 29% par rapport aux cellules contrôles. La latrunculine B a été utilisée initialement à une concentration de 5 ug/ml tout comme le groupe de Laroche et al. (Laroche et al., 2005). Toutefois, il a été remarqué que les cellules étaient sensibles à ce traitement et avaient tendances à entrer en apoptose. Les cellules ont donc été prétraitées avec une concentration de 1 ug/ml de latrunculine B qui s'est révélée être moins dommageable pour les cellules avec moins de mortalité cellulaire. L'internalisation des récepteurs CysLT1 a été diminuée significativement de 43% ($p=0.003$) par ce prétraitement par rapport aux cellules contrôles. Lorsque la latrunculine B est diluée d'un facteur de 10 soit à 0.1 ug/ml, la baisse d'internalisation n'est plus significative ($p>0.05$) même si elle semble visuellement être égale à celle du prétraitement à 1 ug/ml ceci étant dû à une grande variabilité dans les données. Nous avons également observé par microscopie confocale la

désorganisation du réseau d'actine suite à ces prétraitements, ce qui nous a prouvé l'efficacité de ces agents sur la dépolymérisation de l'actine. Les Figures 25B et C montrent que les traitements respectivement avec la cytochalasine D ainsi que la latrunculine B ont été efficaces pour dépolymériser le réseau d'actine. Les récepteurs CysLT1 (en rouge) semblent rester en partie près de la membrane plasmique. Or, l'actine (en vert) est désorganisée et concentrée à certains endroits aux extrémités de la cellule comparativement aux cellules non-prétraitées en Figure 25D qui montrent une belle organisation du réseau d'actine sous forme de filaments continus ainsi que la formation concomitante de fibres de stress d'actine.

Par ailleurs, un autre agent a été étudié sur les cellules 293LT1 soit la colchicine. La colchicine est un agent qui dépolymérise les microtubules, d'autres constituants importants de la structure cellulaire. À une concentration utilisée dans la littérature de 10 ug/ml, la colchicine ne diminue pas l'internalisation des récepteurs CysLT1 et conserve une internalisation à 51%, similaire à celle des cellules contrôles non-prétraitées. La Figure 25E nous montre par microscopie confocale que l'actine (en vert) n'est pas affectée par ce traitement et que les récepteurs CysLT1 (en rouge) internalisent à l'intérieur de la cellule. Toutefois, la localisation des récepteurs CysLT1 semble être diffuse et non localisée à un endroit spécifique.

A

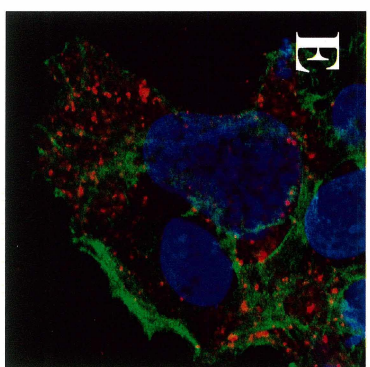
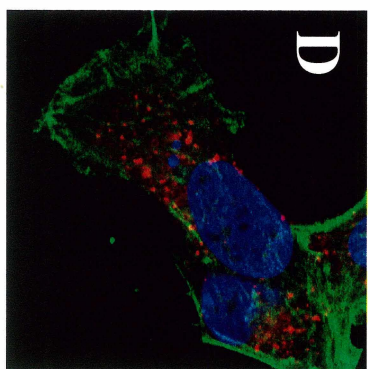
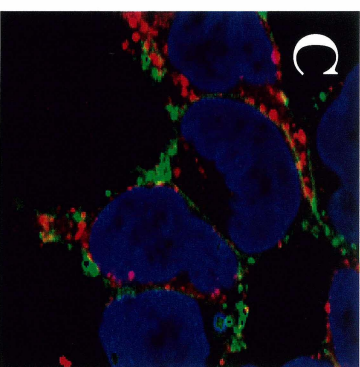
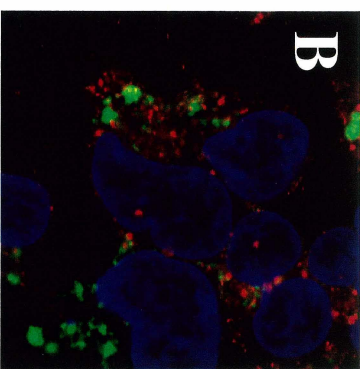
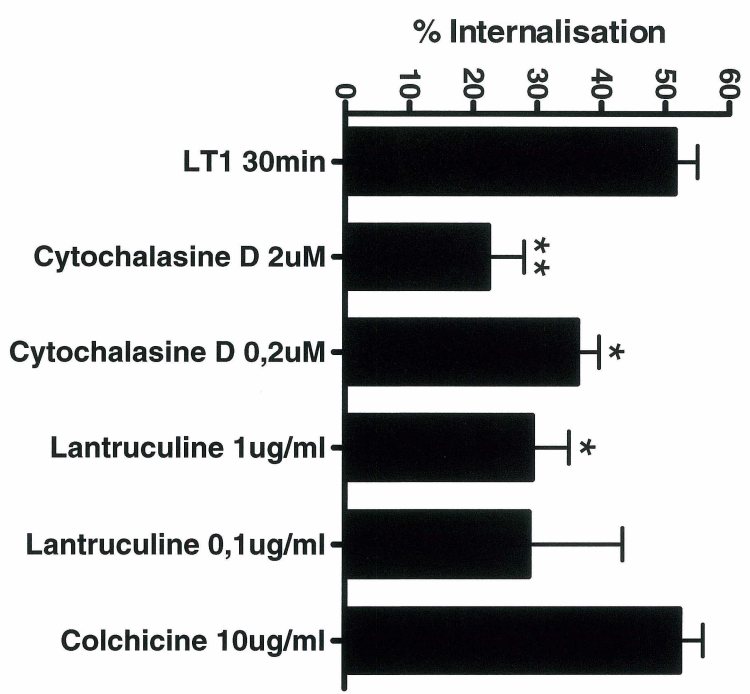


Figure 25. Un réseau d'actine intact est nécessaire pour l'internalisation du récepteur CysLT1. A) Les cellules 293LT1 ont été prétraitées pendant 20 minutes avec différentes concentrations d'agents qui dépolymérisent le cytosquelette d'actine soit la cytochalasine D (2 μ M et 0.2 μ M) et la latrunculine B (1 μ g/ml et 0.1 μ g/ml) ainsi qu'avec un agent qui induit la dépolymérisation des microtubules soit la colchicine (20 μ g/ml). Ensuite, les cellules ont été stimulées au LTD₄ 100 nM pendant 30 minutes à 37°C. L'internalisation du CysLT1 a été étudiée par cytométrie de flux tel que décrit dans Matériel et Méthodes et une analyse statistique par tests t (paireés) de Student a été effectuée (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$) (n = 3 à 8). B) Les cellules 293LT1 ont été prétraitées avec la cytochalasine D (2 μ M) pendant 30 minutes ou C) la latrunculine (1 μ g/ml), D) colchicine (20 μ g/ml) pendant 20 minutes et ont été ensuite stimulées pendant 30 minutes au LTD₄ 100 nM. En Figure E, les cellules n'ont pas été prétraitées. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-c-Myc et par la suite avec l'anticorps secondaire chèvre anti-souris couplé à l'AlexaFluor 488. La phalloïdine Texas-Red a été utilisée pour visualiser l'actine. La fluorescence des cellules a été observée par microscopie confocale. Le rouge, le vert et le bleu représentent respectivement le CysLT1, l'actine et le noyau.

4.12 RÉ-EXPRESSION RAPIDE À LA SURFACE CELLULAIRE DU RÉCEPTEUR CysLT1 APRÈS LE RETRAIT DE L'AGONISTE

Précédemment, il a été montré que l'internalisation du récepteur CysLT1 est dépendante de la liaison au ligand. Toutefois, aucune étude n'a démontré ce qui se passe lorsque l'on retire l'agoniste du milieu après un certain temps de stimulation avec celui-ci à savoir si les récepteurs restent localisés à un certain endroit dans la cellule, s'ils recyclent à la surface ou s'ils sont dégradés. En Figure 26, il a été démontré que la majorité des récepteurs retournent rapidement à la surface lorsque l'on enlève l'agoniste du milieu après une stimulation de 30 minutes. Après 30 minutes de stimulation l'internalisation se situe à $53,3 \pm 2,2 \%$ tandis que 10 minutes et 20 minutes après le retrait de l'agoniste l'internalisation diminue respectivement à $36,3 \pm 3,6\%$ et $25,7 \pm 2,0\%$. Ces résultats démontrent qu'au moins 50% des récepteurs internalisés sont recyclés à la membrane après le retrait de l'agoniste. Il se pourrait aussi qu'une certaine quantité de récepteurs CysLT1 soit dégradée ou séquestrée plus longtemps dans les vésicules.

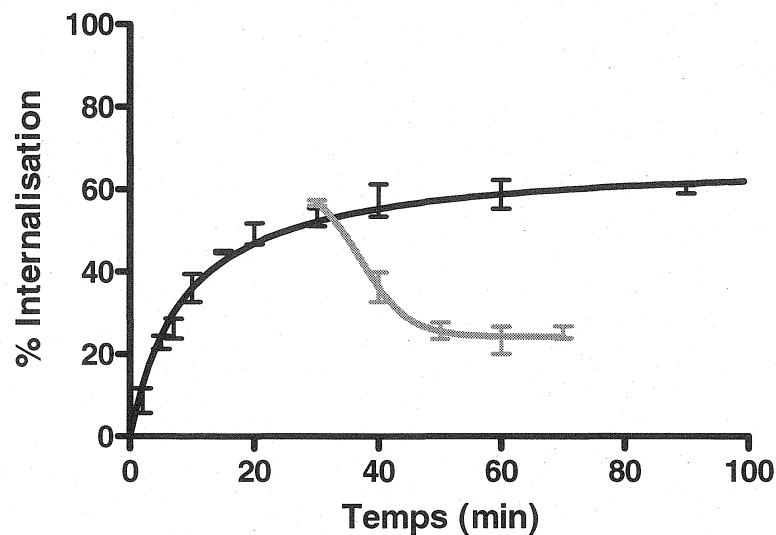


Figure 26. Ré-expression rapide à la surface cellulaire du récepteur CysLT1 après le retrait de l'agoniste. Les cellules 293LT1 ont été stimulées 30 minutes avec 100 nM LTD₄. Ensuite, les cellules ont été lavées avec une solution 2% BSA dans DPBS et incubées avec le milieu pendant différentes périodes de temps allant jusqu'à 1 heure. L'internalisation du récepteur a été déterminée par la quantification du marquage de surface par ELISA tel que décrit dans Matériel et Méthodes. La courbe en noir est celle de l'internalisation du récepteur CysLT1. La courbe en gris représente la courbe de ré-expression des récepteurs à la surface de la cellule suite au lavage des cellules (n=4).

4.13 LOCALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT2

L'étude de l'internalisation du récepteur CysLT2 a pu être possible et réalisable à la suite de la création d'une lignée de cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur CysLT2, produite de la même façon que la lignée 293LT1. Les récepteurs exprimés dans ces cellules portent tous les 2 une étiquette c-Myc en N-terminal permettant ainsi leur quantification par cytométrie de flux. Il a été remarqué que l'expression de surface cellulaire des deux types de récepteurs dans les deux lignées cellulaires était différente. Les cellules 293LT1 expriment le récepteur CysLT1 à la surface cellulaire à 69.8 ± 6.3 % tandis que les cellules 293LT2 expriment le récepteur CysLT2 à $35.0 \pm 8,8$ % (données non-montrées). Cette différence est tout de même intrigante car même après plusieurs tris cellulaires il n'y a pas d'augmentation du pourcentage de récepteurs CysLT2 à la surface de ces cellules. La Figure 27A montre un essai de fixation avec la paraformaldéhyde et de perméabilisation à la saponine des cellules par cytométrie de flux qui a permis d'obtenir les pourcentages d'expression totale (intracellulaire et extracellulaire) des récepteurs CysLT2 dans les cellules 293LT2. Lorsque les cellules sont fixées, le pourcentage d'expression des récepteurs CysLT2 augmente à $56.3 \pm 7.8\%$. Toutefois, ce pourcentage s'élève à $80.5 \pm 6.6\%$ lorsque les cellules sont fixées ainsi que perméabilisées à la saponine. Ces données suggèrent qu'il y aurait une grande quantité de récepteurs CysLT2 à l'intérieur de la cellule. La Figure 27B confirme visuellement les résultats obtenus en cytométrie de flux et montre en rouge la forte localisation des récepteurs CysLT2 au niveau intra-cellulaire ainsi que l'expression des récepteurs à la surface cellulaire. Ces données indiquent que les deux récepteurs CysLT1 et CysLT2 semblent avoir des localisations cellulaires distinctes du moins chez les cellules HEK293.

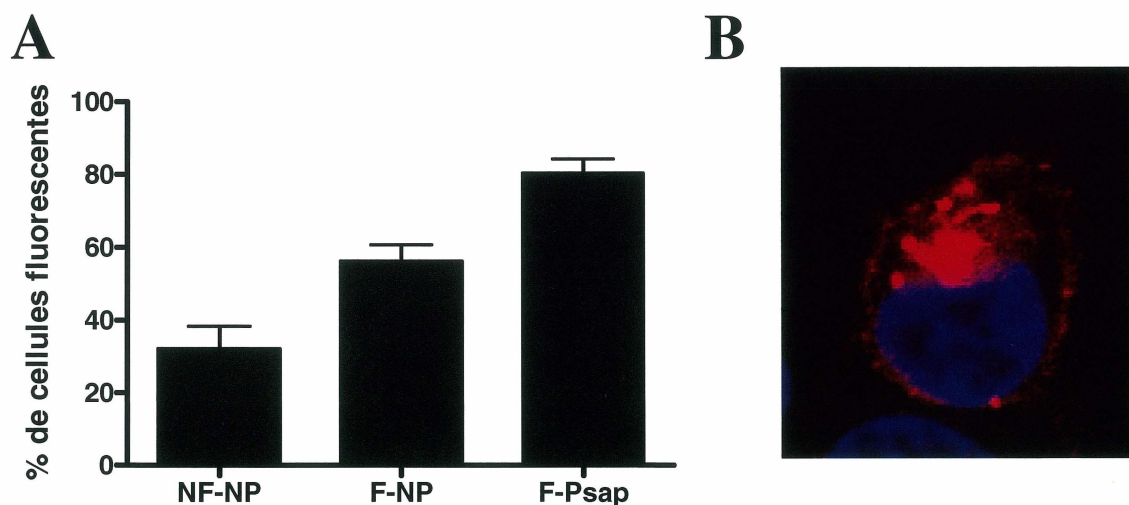


Figure 27. Localisation du récepteur CysLT2. L'expression du récepteur CysLT2 a été analysée par cytométrie de flux tel que décrit dans Matériel et Méthodes. Le pourcentage des cellules 293LT2 marquées seulement avec l'anticorps secondaire a été déduit. Afin de connaître l'expression du récepteur à l'intérieur de la cellule, les cellules ont été fixées avec la paraformaldéhyde et perméabilisées à la saponine 0.1% (n=3) (NF : non-fixé, NP : non-perméabilisé, F : fixé avec la paraformaldéhyde 2%, P : perméabilisé avec la saponine 0.1%). B) Les cellules 293LT2 non-stimulées ont été marquées avec l'anticorps primaire anti-c-Myc et l'anticorps secondaire chèvre anti-souris couplé à l'Alexa-Fluor 488. Le récepteur CysLT2 et le noyau sont illustrés en rouge et bleu respectivement.

4.14 INTERNALISATION ET EXTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT2

Dans la première partie de mon projet de maitrise, il a été montré par différentes techniques que le récepteur CysLT1 internalise de façon importante et soutenue dans le temps soit à 60-70%. L'internalisation du récepteur CysLT2 a été étudiée par

cytofluorométrie chez les cellules 293LT2 avec les mêmes conditions et anticorps que pour l'internalisation du récepteur CysLT1. La seule distinction est le ligand qui a été choisi pour les stimulations soit le LTC₄ à une concentration de 100 nM. Les ligands, LTC₄ et LTD₄, ont la même affinité pour le récepteur CysLT2 (Heise et al., 2000; Nothacker et al., 2000) quoique des expériences d'essais luciférases réalisées dans notre laboratoire ont montré que le LTC₄ était plus puissant pour l'activation du récepteur CysLT2 que le LTD₄ (résultats non illustrés). De façon surprenante, le patron d'internalisation obtenu des récepteurs CysLT2 est assez différent de celui des récepteurs CysLT1. La Figure 28A montre qu'à de courts temps de stimulation soit jusqu'à 1h30, une faible internalisation des récepteurs CysLT2 est notée soit de $5.8 \pm 12.6\%$. Or, lorsque l'on stimule les cellules pendant plus de 2 heures au LTC₄, nous observons, au contraire, une augmentation du pourcentage d'expression du récepteur CysLT2 à la surface cellulaire. Cette externalisation se chiffre à $13.0 \pm 3.4\%$, $18.9 \pm 9\%$, $57.6 \pm 5.2\%$ et $67.4 \pm 2.5\%$ pour des temps de stimulation respectivement de 120 minutes, 180 minutes, 240 minutes et 270 minutes avec le LTC₄.

La Figure 28B montre une expression importante des récepteurs CysLT2 à la surface cellulaire après une stimulation de 4 heures avec le ligand mais qui est également forte et diffuse à l'intérieur de la cellule. Afin de voir s'il y a bel et bien une forte expression à la surface cellulaire, les cellules ont été stimulées au LTC₄ pendant 4 heures mais n'ont pas été perméabilisées. La Figure 28C montre que les récepteurs CysLT2 sont exprimés à la surface cellulaire.

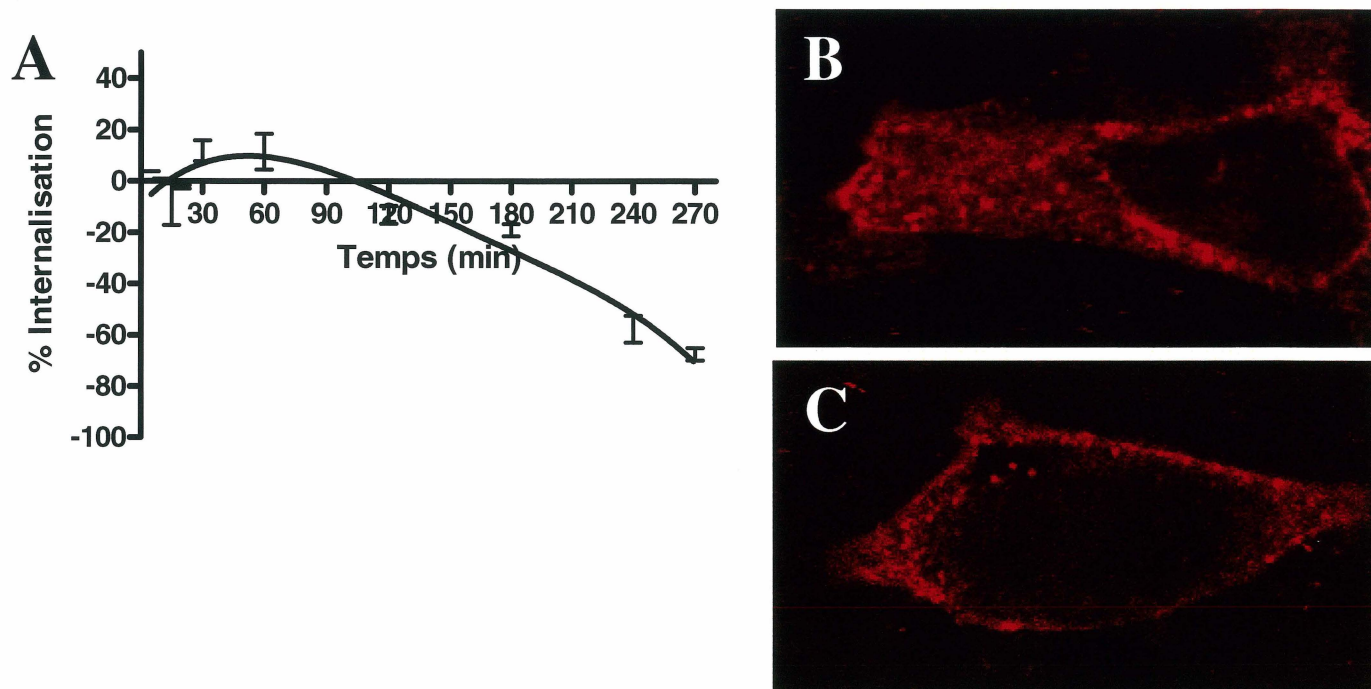


Figure 28. Externalisation du récepteur CysLT2. A) Les cellules 293LT2 ont été stimulées pour les temps indiqués allant de 20 minutes jusqu'à 5 heures avec 100 nM LTC₄ ou EtOH. L'analyse de l'expression de surface du récepteur CysLT2 a été réalisée par cytométrie de flux tel que décrit dans Matériel et Méthodes (n = 2 à 5). Les cellules 293LT2 ont été stimulées 4 heures avec 100nM LTD₄ et B) perméabilisées avec 0.1% triton ou C) non-perméabilisées permettant ainsi de visualiser l'expression du récepteur CysLT2 à la surface de la cellule. Les cellules 293LT2 ont été marquées avec l'anticorps primaire anti-c-Myc et l'anticorps secondaire chèvre anti-souris couplé à l'Alexa-Fluor 488. Photos représentatives de deux expériences indépendantes.

4.15 FONCTIONNALITÉ DES RÉCEPTEURS CysLT2 EXTERNALISÉS

Une élévation de la quantité de récepteurs CysLT2 à la surface cellulaire a été observée après une stimulation de 4 heures avec le LTC₄ comparativement au contrôle stimulé seulement avec le véhicule (EtOH). À présent, il serait intéressant de voir si ces récepteurs CysLT2 exprimés à la surface de la cellule sont fonctionnels. Pour ce faire, nous avons effectué des essais de production des inositol phosphates, une méthode qui permet de quantifier les inositols totaux produits et ainsi valider la fonctionnalité des récepteurs (voir figure 14 du protocole expérimental).

En Figure 29, lorsque des cellules non-prétraitées sont stimulées 45 minutes avec le LTC₄, la production d'inositol phosphates double par rapport au contrôle EtOH et passe de 845 cpm à 1783 cpm. Or, lorsque l'on prétraite les cellules pendant deux heures avec 100 nM LTC₄, qu'on laisse une période de repos de 110 minutes aux récepteurs (resensibilisation des récepteurs) et qu'on les stimule pendant 45 minutes avec 100 nM LTC₄, nous obtenons une élévation de 4,1 fois la production d'inositol phosphates comparativement aux cellules contrôles stimulées pendant 45 minutes avec l'EtOH. Ce ratio reste sensiblement le même soit une hausse de 4,6 fois lorsque les cellules sont prétraitées pendant quatre heures avec 100 nM LTC₄ avec les mêmes conditions que décrit précédemment. Bien que le ratio d'augmentation des inositol phosphates soit sensiblement le même à 2 heures et 4 heures de prétraitement au LTC₄, la production totale des inositol phosphates est deux fois plus élevée à 4 heures (9312 ± 2877 cpm) de prétraitement qu'à 2 heures (4420 ± 423 cpm). Les ratios d'augmentation sont les mêmes parce que les niveaux de base de production d'inositol phosphates lorsque stimulé 45

minutes avec l'EtOH sont différents entre les 2 temps de préincubation au LTC₄ soit à 2 heures (1091 ± 424 cpm) et 4 heures (2029 ± 610 cpm). Des contrôles ont également été effectués où les cellules ont été prétraitées avec seulement du milieu ou milieu/EtOH pendant 4 heures avant les stimulations avec l'EtOH ou le LTC₄ pendant 45 minutes. Les ratios d'élévation de production des inositol phosphates avec les prétraitements milieu seulement ou milieu/EtOH ont été respectivement de 2,55 et 2,17 fois soit équivalents au contrôle non-prétraité mais stimulé au LTC₄.

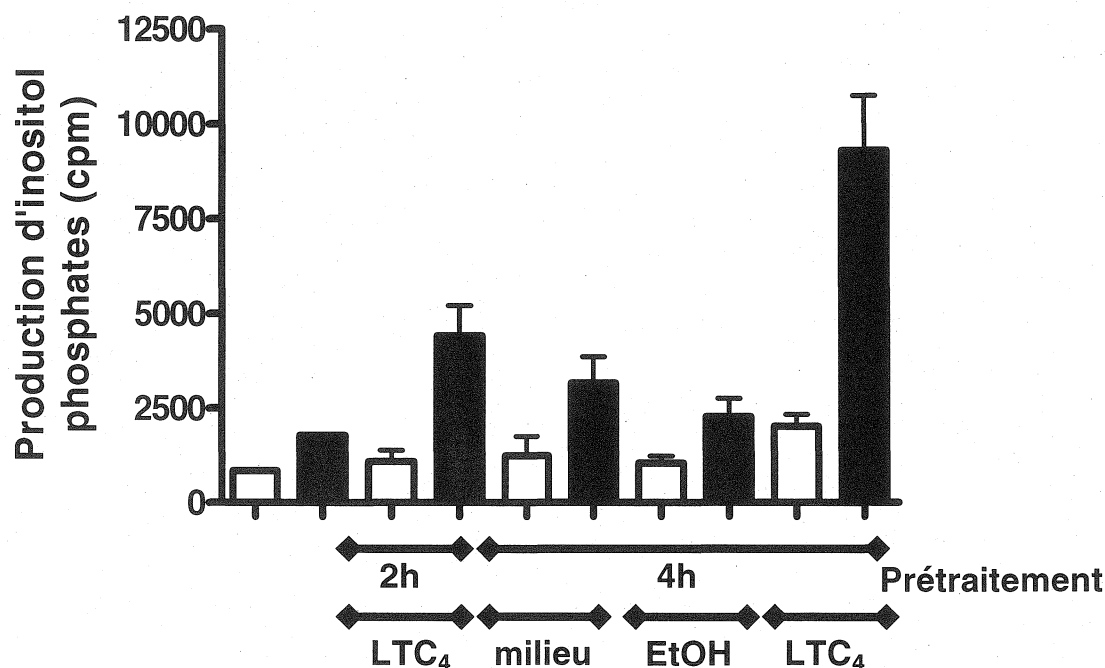


Figure 29. Fonctionnalité des récepteurs CysLT2 externalisés. Les cellules ont été marquées pendant 24 heures avec *Myo*-[³H]Inositol et 0.2% FBS. Ensuite, les cellules ont été stimulées pendant 2 ou 4 heures à 37°C avec soit le milieu, l'EtOH ou le LTC₄ 100 nM en présence de *Myo*-[³H]Inositol. Un lavage avec une solution PBS 2% BSA est ensuite effectué et les cellules sont mises en présence de milieu 0.1% BSA, à 37°C, pour une durée de 2 heures. Cette incubation permet la resensibilisation des récepteurs à la surface cellulaire. Dix minutes avant la fin de l'incubation, une concentration finale de 20 mM LiCl est ajoutée aux cellules. Finalement, les cellules sont stimulées pendant 45 minutes, à 37°C, avec l'EtOH ou 100 nM LTC₄. Le total des inositol phosphates marqués a été compté par scintillation liquide avec un compteur β LKB-Wallac. Les colonnes blanches ont été stimulées 45 minutes à l'EtOH et celles en noir ont été stimulées avec 100 nM LTC₄ (n=4).

4.16 LES RÉCEPTEURS CYSLT1 ET CYSLT2 DÉMONTRENT UN PATRON SIMILAIRE DE PRODUCTION D'INOSITOL PHOSPHATES

Puisque nous avons remarqué des différences majeures entre l'internalisation des récepteurs CysLT1 et CysLT2, il a été intéressant de vérifier si les cinétiques d'accumulation des inositol phosphates étaient différentes. La Figure 30 montre que les deux types de récepteurs ont un patron d'augmentation de production des inositol phosphates qui est semblable. La production d'inositol phosphates augmente de façon progressive pour atteindre un plateau après 3 heures de stimulation où la formation est saturée. Toutefois, il est à noter que la production d'inositol phosphates est plus élevée chez les cellules 293LT1 que les 293LT2.

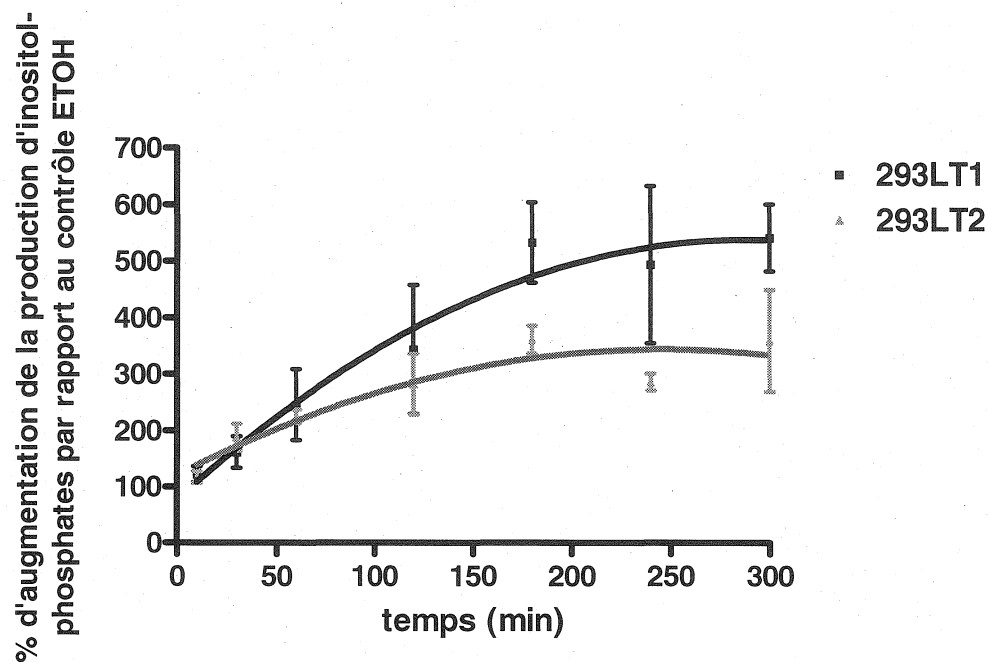


Figure 30. Les récepteurs CysLT1 et CysLT2 démontrent un patron similaire de production d'inositol phosphates. Les cellules ont été stimulées pour les temps indiqués avec l'EtOH ou 100nM LTD₄ pour les 293LT1 ou 100nM LTC₄ pour les cellules 293LT2. Le total des inositol phosphates produits a été compté par scintillation liquide avec un compteur β LKB-Wallac (n=3).

DISCUSSION

5.1 L'INTERNALISATION RAPIDE ET SOUTENUE DU RÉCEPTEUR CYSLT1 EST DÉPENDANTE DE LA CASÉINE KINASE 1, DES PKC ET DE LA DYNAMINE MAIS NE SEMBLE PAS IMPLIQUER LES GRK2, 5 ET 6.

L'internalisation du récepteur CysLT1 a été précédemment étudiée par le groupe de recherche de Penn (Naik et al., 2005). Ces derniers ont produit une construction dans le vecteur pcDNA3 du récepteur CysLT1 portant une étiquette 3-FLAG en N-terminal. Cette construction a été transfectée de façon transitoire pour la plupart des expériences qu'ils ont effectuées. De notre côté, nous avons établi une lignée cellulaire de HEK293 exprimant de façon stable le récepteur CysLT1 portant une étiquette c-Myc en N-terminal. Le groupe de Penn a étudié l'internalisation du récepteur CysLT1 jusqu'à 30 minutes de stimulation chez les cellules Cos-7 et HEK293. L'internalisation était plus importante chez les cellules HEK293 comparativement aux cellules Cos-7 soit respectivement 60% et 40%. Cette différence d'internalisation chez les deux types cellulaires pourrait être due à des niveaux différents d'expression de certaines molécules impliquées dans l'internalisation du récepteur chez ces cellules (Menard et al., 1997). De notre côté, chez la lignée 293LT1, nous observons une internalisation de près de 50% après 30 minutes de stimulation, qui atteint 60 à 70% après plus de 1 heure et reste soutenue à des temps de stimulation allant jusqu'à 4 heures. Un traitement avec un antagoniste spécifique du récepteur CysLT1, le Montélukast, nous a permis de confirmer que l'internalisation du récepteur CysLT1 est dépendante de la liaison à son ligand.

Le groupe de Penn par ses travaux a démontré que l'internalisation du récepteur CysLT1 induite par l'agoniste était indépendante des arrestines (Naik et al., 2005). La preuve la

plus convaincante a été amenée par des expériences sur les fibroblastes embryonnaires murins déficients en arrestine 2 et 3. Ils ont remarqué que l'internalisation du récepteur CysLT1 chez ces fibroblastes déficients en arrestine 2 et 3 est assez similaire à celle des souris contrôles non-transgéniques. Étant donné qu'il est connu que l'internalisation du récepteur β 2-adrénergique est dépendante des arrestines, il est normal qu'ils aient obtenu une faible internalisation de ce récepteur dans les fibroblastes déficients en arrestine 2 et 3. Ces résultats ajoutés à ceux obtenus par ELISA de surface cellulaire avec des mutants et dominants négatifs d'arrestines n'ayant pas diminué l'internalisation du récepteur, suggèrent que les arrestines ne sont pas impliquées dans l'internalisation du récepteur CysLT1. De notre côté, nous avons tenté de montrer l'indépendance des arrestines dans l'internalisation du récepteur CysLT1 par immunofluorescence avec d'autres constructions mutées ou délétées d'un domaine d'arrestines 2 et 3. Les mutants dominants négatifs d'arrestine 2(V53D) et 3(V54D), lient la clathrine mais n'interagissent plus avec les récepteurs phosphorylés. Quant à eux, les mutants d'arrestines 2 (319-418) et 3 (210-410) ont perdu leur domaine de liaison à la clathrine et à AP-2 (Krupnick et al., 1997). La plupart de ces constructions dominantes négatives n'ont toutefois pas empêché l'internalisation du récepteur CysLT1 après la stimulation avec l'agoniste. Or, le mutant d'Arr3 (V54D) semble avoir diminué l'internalisation du récepteur CysLT1 car les récepteurs sont localisés près de la membrane sous forme de clusters après la stimulation. Il a été également observé que le mutant d'arrestine 2 (319-418) ne semble pas avoir la même distribution que les autres mutants d'arrestines appuyant ainsi le fait que tous ces mutants d'arrestines semblent très peu efficaces. Toutefois, les arrestines pourraient être utilisées dans le cas où il y a surexpression des

arrestines, comme c'est le cas du récepteur AT1 (Zhang et al., 1996a). Naik et al. ont observé une hausse de 15 à 25% de l'internalisation du récepteur CysLT1 lorsqu'il y a surexpression des arrestines 2 ou 3 chez les cellules Cos-7 cotransfectées avec le CysLT1 par rapport aux cellules transfectées seulement avec le CysLT1. La cotransfection d'arrestines a aussi diminué la production d'inositol phosphates indiquant que les arrestines pourraient promouvoir la désensibilisation en plus de l'internalisation des récepteurs notamment en surexpression (Naik et al., 2005).

Le recyclage rapide des récepteurs CysLT1 observé suite au retrait de l'agoniste donne des indications sur le routage intracellulaire du récepteur CysLT1. Le récepteur CysLT1 pourrait être dirigé vers les endosomes précoces suite à son internalisation pour être rapidement recyclé à la membrane. Or, les courbes d'internalisation du récepteur CysLT1 (Figure 16A et B) montrent que les récepteurs semblent rester longtemps dans la cellule en présence de l'agoniste. Certaines données préliminaires obtenues dans notre laboratoire montrent une colocalisation de Rab5, un marqueur des endosomes précoces, avec le récepteur CysLT1 suite à des stimulations de 5 à 30 minutes avec le LTD₄ (données non montrées). Ces résultats obtenus suggèrent que le routage intracellulaire pourrait s'effectuer via les endosomes précoces.

Le modèle canonique de désensibilisation homologue des récepteurs implique notamment une phosphorylation par les kinases couplées aux protéines G (GRK) (Krupnick and Benovic, 1998). Il n'y a pas de site consensus de reconnaissance par les GRK bien définis dans la littérature excepté que ces molécules ont une préférence pour les résidus sérines et

thréonines qui se trouvent près de résidus acides tels que l'aspartate ou le glutamate (Chen et al., 1993; Pitcher et al., 1998). Or, le récepteur CysLT1 possède des motifs potentiels de phosphorylation par la caséine kinase 1 α de type II S/T(P)X_nS/T (n = 1 à 3) soit SLSSVT(313 à 318) ou par la caséine kinase 2 (S/T)XX(D/E) soit SLPE (326 à 329) (Lynch et al., 1999; Meggio and Pinna, 2003; Tobin, 2002) qui pourraient aussi être utilisés par les GRK. Tout d'abord, nous avons évalué par immunofluorescence la contribution des GRK 2, 5 et 6 dans l'internalisation du récepteur CysLT1 via la cotransfection de dominants négatifs de GRK. Toutefois, aucun mutant de GRK n'a empêché l'internalisation du récepteur suggérant que les GRK 2, 5 et 6 ne semblent pas impliquées dans ce processus. Il faut cependant prendre en considération que ces dominants négatifs ont une affinité 10X plus basse pour les RCPG. Ainsi, leur association au récepteur aurait pu être diminuée résultant en une efficacité faible des dominants négatifs sur l'internalisation du récepteur CysLT1. De plus, ces résultats d'internalisation par immunofluorescence ne sont pas quantitatifs et étant donné que nous n'avons pas inclu de cellules non-cotransfectées avec les dominants négatifs, il est difficile de comparer l'internalisation. Nous ne pouvons pas conclure car ce n'est peut-être pas du tout ou rien. Ensuite, nous avons étudié la possibilité qu'il y ait présence d'une voie alternative de phosphorylation des récepteurs par les caséines kinases 1 ou 2. Il a été démontré que la caséine kinase 1 α pouvait phosphoryler les récepteurs muscariniques M1 et M3 ainsi que de la rhodopsine (Budd et al., 2000; Tobin et al., 1997). D'autres groupes ont montré que la caséine kinase 2 pouvait phosphoryler le récepteur à hormone de libération de la thyrotropine ainsi que le récepteur de la transferrine et que cette phosphorylation était nécessaire pour leur internalisation (Hanyaloglu et al., 2001)

(Cotlin et al., 1999). Ainsi, nous avons testé deux inhibiteurs spécifiques de la caséine kinase 1 et 2. Une baisse significative de l'internalisation a été observée seulement pour l'inhibiteur spécifique de la caséine kinase 1, le CK1-7, suggérant que celle-ci serait impliquée dans la désensibilisation du récepteur menant à son internalisation.

Étant donné que les protéines kinases A et C (PKA, PKC) pourraient jouer un rôle dans la désensibilisation menant à l'internalisation du récepteur CysLT1, l'implication de ces dernières a été étudiée via différents inhibiteurs de ces protéines. Le groupe de Penn a examiné l'effet d'inhibiteurs de PKC tels que le Bis, un inhibiteur de toutes les isoformes de PKC, et Ro-32-0433, un inhibiteur des PKC classiques (Naik et al., 2005). Ces deux inhibiteurs ont bloqué de façon similaire l'internalisation du récepteur CysLT1 soit de 50% chez les cellules HEK293 (Naik et al., 2005). Nous avons également testé quelques inhibiteurs de PKC, soit le GF109203X, le Go6976 ainsi que le Rottlerin respectivement un inhibiteur général des PKC, un inhibiteur des PKC classiques ainsi qu'un inhibiteur sélectif de PKC δ . Les inhibiteurs ont causé une baisse d'environ la moitié de l'internalisation du récepteur CysLT1. Toutefois, le GF10203X a montré une diminution de l'internalisation légèrement supérieure aux autres inhibiteurs compte tenu qu'il agit sur plusieurs isoformes de PKC. Le H89, un inhibiteur de PKA a aussi été étudié, toutefois il n'a pas affecté l'internalisation du récepteur CysLT1. Ces résultats ont appuyé ceux du groupe de Penn et suggèrent que les PKC α , β I, β II, γ et δ sont impliquées dans l'internalisation du récepteur CysLT1 et jouent probablement leur rôle au niveau de la désensibilisation des récepteurs. D'autres récepteurs sont également désensibilisés par les PKC soit le récepteur de l'angiotensine, de la vasopressine et le récepteur muscarinique

M1 (Haga et al., 1996; Zhang et al., 1996b). Notamment, il a été démontré chez le récepteur angiotensine II de type 1B que l'inhibiteur GF109203X bloque complètement la désensibilisation dépendante de la PMA (Tang et al., 1995). Une question intéressante à se poser est si la désensibilisation et l'internalisation des récepteurs serait encore possible si l'on inhibait l'action des PKC ainsi que de la caséine kinase 1, deux molécules importantes pour l'internalisation du récepteur CysLT1. Étant donné que les tentatives d'inhibition de l'activité des GRK, des PKA et de la caséine kinase 2 n'ont pas diminué l'internalisation du récepteur CysLT1, nous émettons l'hypothèse que presque toute l'internalisation serait bloquée en inhibant l'action des PKC et de la caséine kinase I. Il a été également démontré que la caséine kinase 1 pouvait phosphoryler la protéine kinase C (Vila et al., 1989). Or, si l'on inhibe l'action de la caséine kinase 1, nous supposons que l'activation des PKC pourrait être diminuée et ultimement l'internalisation en serait affectée. Dans ce cas-ci, l'inhibition de la caséine kinase et de PKC ne seraient pas additifs et l'on ne bloquerait pas toute l'internalisation.

Plusieurs groupes ont démontré le rôle crucial de la queue C-terminale des récepteurs pour leur internalisation notamment des récepteurs BLT1, du PAF et le TP β (Chen et al., 2002; Chen et al., 2004; Parent et al., 1999). Naik et al. ont montré initialement que les acides aminés 310 à 321 étaient indispensables à l'internalisation du récepteur CysLT1 dans les cellules Cos-7 par ELISA de surface cellulaire (Naik et al., 2005). Nous avons étudié différents mutants de délétion du récepteur CysLT1 qui nous ont permis de confirmer leur résultat et de montrer la nécessité des acides aminés 304 à 321 pour l'internalisation du récepteur CysLT1 dans les cellules HEK293 par cytométrie de flux.

Ces résultats obtenus avec les mutants du récepteur CysLT1 confirment les résultats obtenus avec les inhibiteurs de caséines kinases, de PKA et de PKC. Le site potentiel de phosphorylation par la caséine kinase 1 se situe entre les acides aminés 313 à 318 tandis que celui de la caséine kinase 2 se situe aux acides aminés 326 à 329. Le mutant 327stop, qui perd la majorité du site potentiel de phosphorylation par la caséine kinase 2, affiche une internalisation similaire au récepteur CysLT1 entier. Ce résultat va de pair avec celui obtenu avec le DRB, un inhibiteur de la caséine 2, qui n'a pas diminué l'internalisation du récepteur CysLT1. Toutefois, le mutant 311stop, où le site potentiel de phosphorylation par la caséine kinase 1 a été délété, montre une baisse significative d'internalisation de 68% par rapport à celle du récepteur CysLT1 sauvage. Or, ce résultat va dans le même sens que la baisse significative d'internalisation du récepteur CysLT1 obtenue avec le CK1-7, un inhibiteur spécifique de caséine kinase 1. Les résultats obtenus avec les mutants de délétion du récepteur CysLT1 appuient ceux obtenus avec les inhibiteurs des caséines kinases 1 et 2 et suggèrent le rôle de la caséine kinase 1 dans l'internalisation du récepteur CysLT1. Par ailleurs, la portion C-terminale du récepteur CysLT1 qui a été délétée lors des essais d'internalisation contient plusieurs sites potentiels de phosphorylation par les protéines kinases A (motifs RR/Kx₁₋₂S/T ou RxS/T) ou protéines kinases C (motifs S/TxK/R) (Pearson and Kemp, 1991; Yuan et al., 1994). Le mutant 321stop élimine le motif potentiel de phosphorylation par PKA soit RKKAS (322 à 326) et amène une baisse d'internalisation non significative par rapport au récepteur complet. Toutefois, lorsque l'on délète en grande partie un autre site potentiel de phosphorylation par PKA soit RKHS (310 à 313) avec le mutant 311 stop, nous obtenons une baisse significative de 68% de l'internalisation par rapport au récepteur

CysLT1 sauvage. Étant donné que le H89, un inhibiteur spécifique de PKA, n'a pas diminué l'internalisation du récepteur, la baisse observée avec le mutant 311 stop proviendrait de l'effet de la caséine kinase 1. Ces résultats indiquent donc que les PKA ne sont probablement pas importants dans l'internalisation du récepteur CysLT1. La délétion d'un site potentiel de phosphorylation par PKC soit TFR (308 à 310) et par PKA soit RLS (305 à 307) avec le mutant 304stop inhibe presque entièrement l'internalisation du récepteur comparativement au récepteur entier. Bref, plusieurs résidus tels sérines et thréonines localisés dans la queue C-terminale du récepteur pourraient être des cibles de phosphorylation potentielles notamment par les GRK, les caséines kinases ou les protéines kinases étant indispensables à l'internalisation du récepteur CysLT1.

Le groupe de Penn a aussi montré que le mutant de dynamine K44A cotransfecté de façon transitoire avec la construction Flag-CysLT1 dans les cellules HEK293, n'inhibait que partiellement, soit de moitié, l'internalisation du récepteur CysLT1 par ELISA de surface cellulaire (Naik et al., 2005). Ils ont alors suggéré que les récepteurs CysLT1 pourraient emprunter à la fois des voies d'endocytose dépendantes et indépendantes de la dynamine. Nous avons également étudié dans notre laboratoire l'implication de la dynamine avec le dominant négatif de la dynamine K44A dans les cellules 293LT1 mais cette fois-ci par immunofluorescence. Les résultats obtenus montrent que la majorité des récepteurs des cellules cotransfectées avec le dominant négatif de dynamine restent à la surface cellulaire comparativement aux récepteurs d'une cellule voisine non-transfectée qui eux internalisent normalement. Nos résultats suggèrent que la voie dépendante de la dynamine serait majoritairement empruntée par le récepteur CysLT1. Les différences

majeures entre les 2 techniques utilisées, par le groupe de Penn et notre groupe, soit l'internalisation par ELISA de surface cellulaire et l'immunofluorescence, est au niveau de la quantification possible de l'internalisation et de la visualisation au niveau cellulaire de l'effet de l'inhibiteur. Par immunofluorescence, nous pouvons notamment observer ce qui se passe au niveau de la cellule qui est cotransfectée avec le dominant négatif de dynamine ainsi que le récepteur CysLT1. Par ELISA de surface cellulaire, nous ne savons pas si la transfection de la construction Flag-CysLT1 a été plus efficace que celle du dominant négatif de dynamine et ultimement si la quantification totale de l'internalisation est altérée par des cellules transfectées seulement avec la construction Flag-CysLT1 qui internalisent normalement. Toutefois, par immunofluorescence, nous observons également quelques récepteurs à l'intérieur de la cellule après la stimulation indiquant qu'il ne faut pas ignorer la possibilité que des voies indépendantes de la dynamine puissent être utilisées comme l'a mentionné le groupe de Penn. La plupart des voies d'internalisation connues sont dépendantes de la dynamine telles que la voie dépendante des clathrines et des caveolae. Seule la voie dépendante des radeaux lipidiques serait indépendante de l'action de la dynamine (Damm et al., 2005; Kirkham and Parton, 2005b), une voie qui sera discutée plus loin dans ce mémoire.

5.2 INTERNALISATION DÉPENDANTE DES VÉSICULES DE CLATHRINE ET DÉPENDANTE DES RADEAUX LIPIDIQUES DU RÉCEPTEUR CYSLT1.

Le groupe de Penn a montré que l'internalisation du récepteur CysLT1 est indépendante des arrestines et dépendante de la dynamine. La prochaine étape du projet a été d'étudier quelles voies d'internalisation connues dans la littérature étaient empruntées par le

récepteur CysLT1. Les voies les mieux connues et caractérisées jusqu'à maintenant sont la voie dépendante des vésicules de clathrine et la voie dépendante des radeaux lipidiques et/ou des caveolae (Kirkham and Parton, 2005a). Premièrement, nous avons vérifié si la voie dépendante des vésicules de clathrine était impliquée dans l'internalisation du récepteur CysLT1. Différents agents soit le sucrose et la concanavaline A, connus dans la littérature pour bloquer l'internalisation des récepteurs empruntant la voie dépendante des vésicules de clathrine (Le Gouill et al., 1997; Pippig et al., 1995), se sont avérés efficaces pour diminuer de façon importante et significative l'internalisation induite par l'agoniste. De plus, une colocalisation de la clathrine et les récepteurs CysLT1 après 5 minutes de stimulation avec l'agoniste supporte l'importance de ces molécules pour l'internalisation du récepteur CysLT1. Or, cette colocalisation par immunofluorescence pourrait aussi être associée à des vésicules de clathrine retournant à la surface mais non à l'internalisation. Un indice intéressant de l'internalisation du récepteur CysLT1 via les vésicules de clathrine provient de données préliminaires obtenues de la colocalisation entre Rab5 et le récepteur CysLT1 après 5 à 30 minutes de stimulation au LTD₄ (données non montrées). Rab5 régule la fusion des vésicules endocytiques en provenance de la membrane avec les endosomes précoces (Gorvel et al., 1991). Il a été aussi démontré que le complexe Rab5-GDI est requis pour permettre la séquestration du ligand dans les puits de clathrine (McLauchlan et al., 1998). Étant donné que Rab5 se retrouve non seulement au niveau des endosomes précoces mais au niveau de la membrane plasmique et sur les vésicules de clathrine (Chavrier et al., 1990), nous suggérons que cette colocalisation après stimulation puisse indiquer une fois de plus l'implication de la voie dépendante des vésicules de clathrine pour l'internalisation du récepteur CysLT1.

L'internalisation du récepteur CysLT1 ne semble pas impliquer les arrestines mais est dépendante de la dynamine et des vésicules de clathrine et ainsi ressemble à celle des récepteurs BLT1 et muscarinique M3 (Chen et al., 2004; Lee et al., 1998; Popova and Rasenick, 2004). Cependant, nous ne savons pas comment tout le processus est régulé. De quelle façon les molécules AP-2 sont recrutées à la membrane étant donné que les arrestines ne semblent pas nécessaires à l'internalisation du récepteur CysLT1. Nous ne pouvons pas rejeter l'hypothèse que la liaison des arrestines au récepteur activé soit très transitoire et difficilement détectable. Pourtant le récepteur de la thrombine (PAR-1), dont l'internalisation est indépendante des arrestines, a besoin des arrestines pour la désensibilisation du récepteur (Paing et al., 2002). Mais comment sont recrutées la molécule AP-2 et les vésicules de clathrine lorsque les arrestines ne sont pas recrutées au récepteur? Notre récepteur CysLT1 ne possède pas de motifs YxxΦ ou dileucines qui peuvent interagir directement avec les sous-unités d'AP-2 (Boll et al., 1996; Hofmann et al., 1999; Ohno et al., 1995). Toutefois, le récepteur CysLT1 possède un motif NPxxY soit DPLLY (291 à 295) notamment impliqué dans l'endocytose médiée par les vésicules de clathrine de plusieurs récepteurs qui dans notre cas pourrait aussi interagir avec une molécule intéressante. Le groupe de Mitchell a montré chez le récepteur 5-HT_{2A} ainsi que pour d'autres récepteurs qu'une mutation N376D du motif conservé NPxxY altérerait la préférence de liaison des protéines de fusion GST du domaine C-terminal de Arf1 et Arf6 (Johnson et al., 2006). Or, le NPxxY et DPxxY interagiraient préférentiellement avec Arf1 et Arf6. Le récepteur CysLT1 pourrait ainsi se lier à Arf6, une molécule qui promouvoit le recrutement et s'associe directement à certaines protéines adaptatrices

telles que AP-2 et la clathrine (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006; Paleotti et al., 2005). L'interaction de Arf6 avec le récepteur et son importance dans l'internalisation dépendante des vésicules de clathrine du récepteur CysLT1 reste à être définies. L'utilisation de dominants négatifs de Arf6 permettrait de mieux définir le rôle de cette molécule dans l'internalisation du récepteur CysLT1.

En second lieu, nous avons étudié si la voie dépendante des radeaux lipidiques et des caveolae pourrait aussi être impliquée dans l'internalisation du récepteur CysLT1. Nous avons étudié plusieurs agents soit la méthyl- β -cyclodextrine, la filipine et le nystatin qui désorganisent ou extraient le cholestérol de la membrane. Il a été démontré par microscopie électronique que les membranes plasmiques des cellules traitées avec ces agents deviennent lisses probablement dû à la perte de la cavéoline et donc des caveolae (Patel et al., 2006; Rothberg et al., 1992). Un prétraitement à la méthyl- β -cyclodextrine a amené une importante diminution de 71% de l'internalisation du récepteur CysLT1. Étant donné qu'il a été démontré dans la littérature que cet agent pouvait avoir un effet sur la voie dépendante des vésicules de clathrine, nous ne pouvons pas discerner si les radeaux lipidiques/caveolae sont aussi affectés par ce traitement (Rodal et al., 1999). Or, un prétraitement avec la filipine a empêché significativement l'internalisation du récepteur CysLT1 en l'abaissant de 60% par rapport aux cellules contrôles. Ce résultat amène un indice plus intéressant de la dépendance d'un domaine riche en cholestérol pour l'internalisation du CysLT1 et suggère ainsi un rôle possible des radeaux lipidiques et/ou des caveolae pour l'internalisation du récepteur. Le nystatin, un agent qui agit via le même mécanisme que la filipine, soit en se liant au cholestérol et altérant ainsi sa

répartition, a été aussi investigué. À une concentration de 50 ug/ml de nystatin, nous observons une inhibition significative de l'internalisation du récepteur CysLT1. Ce résultat va donc dans le même sens que ceux obtenus avec la filipine et indiquerait un rôle d'un domaine riche en cholestérol dans l'internalisation du récepteur CysLT1 et par le fait même suggère une implication des radeaux lipidiques et/ou des caveolae. Finalement, nous avons étudié l'effet d'un autre agent sur l'internalisation du récepteur CysLT1. Il a été démontré que la génistéine, un inhibiteur des tyrosines kinases, pouvait inhiber la phosphorylation de la cavéoline-1 bloquant ainsi l'endocytose via les caveolae (Aoki et al., 1999). La génistéine s'est donc montrée efficace pour diminuer l'internalisation du CysLT1 de 58% par rapport au contrôle non-prétraité. Or, cet agent n'est pas très spécifique car il y a certaines évidences que l'internalisation via les radeaux lipidiques pourrait être dépendante des tyrosines kinases donc possiblement affecté par la génistéine (Damm et al., 2005; Kirkham and Parton, 2005a). De plus, beaucoup d'événements de phosphorylation de tyrosine sont importants dans l'internalisation dépendante de la clathrine. Afin d'investiguer davantage l'implication des caveolae, nous avons réalisé des études de colocalisation du récepteur CysLT1 et des caveolae par immunofluorescence. Nous avons cotransfecté les cellules 293LT1 avec une construction de cavéoline 1 (Cav-1) couplée à GFP. Si l'implication des caveolae s'avère juste, les récepteurs CysLT1 devraient se retrouver initialement et après stimulation dans les caveolae. Or, nous n'avons pas observé de colocalisation entre le récepteur CysLT1 et Cav-1 qui montrent des localisations différentes lorsque non-stimulé et même après 5 minutes de stimulation. Étant donné que nous sommes en état de surexpression de la cavéoline 1 il se pourrait que le patron de localisation de la cavéoline soit différent des

conditions endogènes. Notamment, il a été démontré chez les cellules HEK293 que la cavéoline endogène se situe majoritairement à la surface cellulaire sous forme de clusters et un peu intracellulairement (Roseberry and Hosey, 2001). Or, nos résultats montrent plutôt une forte expression de la cavéoline 1 à l'intérieur de la cellule, ce qui diffère de la localisation endogène de la cavéoline. Certaines expériences préliminaires d'interaction de protéines in-vivo par la technique du BRET (transfert d'énergie de résonance de bioluminescence) ont montré qu'il n'y avait pas d'interaction en absence ou présence du ligand entre le récepteur CysLT1 et la cavéoline-1. Une interaction entre ces 2 molécules pourrait nous indiquer que le récepteur se retrouve dans les caveolae. Pour être certain de la localisation hors caveolae du récepteur CysLT1, il faudrait effectuer des études en microscopie électronique, une méthode nous permettant de bien situer les caveolae et de vérifier s'il y a présence ou non du récepteur dans ces structures. Il existe également des ARNi de cavéoline-1 ou des formes dominants négatifs de cavéoline-1 (P132L-cav1) qui pourraient prouver d'une manière plus convaincante l'implication des caveolae pour l'internalisation du récepteur CysLT1 (Griffoni et al., 2000; Nasu et al., 1998; Syme et al., 2006). Les résultats obtenus jusqu'à maintenant suggèrent qu'une perturbation du contenu en cholestérol de la membrane affecterait l'internalisation du récepteur CysLT1 dépendante des radeaux lipidiques et peut-être des caveolae. Cependant, d'autres études devront être réalisées pour s'en assurer de manière convaincante. Le récepteur CysLT1 posséderait 2 voies d'internalisation soit via les vésicules de clathrine et possiblement via les radeaux lipidiques ce qui est très avantageux pour la cellule. Deux voies d'endocytose amènent des mécanismes cellulaires assurant une désensibilisation plus rapide et régulant la resensibilisation. La désensibilisation est importante car elle permet de protéger les

cellules de potentiels dommages dus à une surstimulation. En trop forte concentration de ligand, les récepteurs auraient avantage à utiliser les deux voies d'internalisation afin de réguler négativement plus rapidement les réponses cellulaires et ainsi éviter des effets toxiques. La concentration du ligand pourrait notamment influencer sur les voies empruntées par le récepteur. Il a été démontré que les récepteurs β 1-adrénérique, à l'endothéline ETA et cholecystokinines peuvent emprunter à la fois la voie dépendante des clathrines et des caveolae (Okamoto et al., 2000; Rapacciuolo et al., 2003; Roettger et al., 1995). À une concentration maximale efficace d'agoniste, le récepteur β 1-adrénérique s'internalise de façon équivalente via les vésicules de clathrine et les caveolae (Rapacciuolo et al., 2003). Les deux voies contribuent toutes deux à la moitié de la réponse observée et les deux voies sont additives. À de faibles concentrations, l'endocytose via les vésicules de clathrine est favorisée. De plus, il a été montré pour le récepteur β 1-adrénérique que différents types de désensibilisation (homologue/hétérologue) pourraient guider l'internalisation vers une voie spécifique. Une phosphorylation par PKA oriente l'internalisation via les caveolae tandis qu'une phosphorylation par les GRK dirige vers les vésicules de clathrine (Rapacciuolo et al., 2003). Quant au récepteur de l'endothéline, l'état oxydatif du cholestérol à la surface cellulaire va amener une préférence pour une voie plutôt qu'une autre (Okamoto et al., 2000). Finalement, le récepteur cholecystokinine peut utiliser les deux voies d'endocytose mais s'internalise préférentiellement via les vésicules de clathrine (Roettger et al., 1995). Le groupe de Miller a proposé que le compartiment vésiculaire lisse ressemblant à une caveolae permet la resensibilisation rapide du récepteur tandis que la voie classique via les vésicules de clathrine est importante pour la régulation à la baisse

du récepteur via les lysosomes et la resensibilisation plus lente (Roettger et al., 1995). Concernant le récepteur CysLT1, d'autres études devront être réalisées pour connaître les voies qui sont privilégiées en fonction des molécules qui phosphorylent le récepteur ou de l'état oxydatif du cholestérol à la surface de la cellule. De plus, il serait intéressant de pouvoir associer la voie d'internalisation et son rôle au niveau de la resensibilisation/régulation à la baisse des récepteurs.

5.3 UN RÉSEAU D'ACTINE INTACT SEMBLE ÊTRE NÉCESSAIRE POUR PERMETTRE L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR CYSLT1.

Précédemment, nous avons remarqué, par microscopie confocale (Figure 15), une réorganisation du cytosquelette d'actine des cellules 293LT1 stimulées avec le LTD₄. Nous nous sommes demandé si cette réorganisation était nécessaire pour permettre l'internalisation du récepteur CysLT1. Il a été démontré dans la littérature que l'internalisation de plusieurs récepteurs tels thromboxane A₂, β -adrénergiques et P2Y₂ nécessitent un réseau d'actine intact et fonctionnel (Laroche et al., 2005; Tulapurkar et al., 2005; Volovyk et al., 2006). Nous avons donc évalué différents agents, soit la cytochalasine D et la latrunculine B qui agissent au niveau de l'actine en induisant sa dépolymérisation (Laroche et al., 2005; Volovyk et al., 2006). Ainsi, nous avons obtenu des diminutions d'internalisation significatives de 57% et 43% suite à des prétraitements avec respectivement la cytochalasine D et la latrunculine B. Étant donné que la latrunculine B n'a pas induit une baisse plus importante de l'internalisation que la cytochalasine D, les filaments d'actine corticaux des cellules 293LT1 ne semblent pas jouer un rôle majeur dans l'internalisation du récepteur CysLT1 (Gaidarov et al., 1999;

Pendleton et al., 2003). Toutefois, les deux agents agissent principalement sur la polymérisation des fibres de stress d'actine et affectent ainsi l'invagination de la membrane et/ou de la scission des vésicules. De plus, la colocalisation du récepteur CysLT1 et l'actine observée sur la figure 15 après 1 minute de simulation renforce l'hypothèse de la participation de l'actine dans l'endocytose du récepteur CysLT1. L'implication des microtubules pour l'internalisation du récepteur CysLT1 a été également investiguée via la colchicine. Cet agent qui induit la dépolymérisation des microtubules ne s'est pas avéré efficace pour diminuer l'internalisation du récepteur CysLT1. Toutefois, nous observons que la distribution du récepteur CysLT1, après une stimulation de 30 minutes, est diffuse à l'intérieur des cellules et ne semble pas se concentrer dans la région périnucléaire (Figure 25D). Ce résultat suggère une implication des microtubules pour le routage intracellulaire du récepteur et d'autres études devront être réalisées pour démystifier ce rôle possible.

5.4 LOCALISATION DIFFÉRENTIELLE DES RÉCEPTEURS CYSLT1 ET CYSLT2.

Nous avons démontré précédemment chez les cellules 293LT1 que le récepteur CysLT1 majoritairement situé à la membrane plasmique (70% d'expression de surface) s'internalise fortement à l'intérieur de la cellule suite à une stimulation avec son agoniste le LTD₄. Or, la lignée cellulaire 293LT2, n'exprime à sa surface cellulaire qu'environ 35% de récepteurs CysLT2 avec les mêmes conditions de marquage que pour le récepteur CysLT1. Nous avons alors vérifié par cytométrie de flux la présence de récepteurs CysLT2 à l'intérieur de la cellule via une perméabilisation à la saponine. Ces expériences

nous ont permis de découvrir une grande quantité intracellulaire de récepteurs CysLT2. La localisation des récepteurs CysLT2 a également été confirmée par microscopie confocale où l'on obtient sensiblement le même patron qu'en cytométrie de flux soit une faible proportion de récepteurs CysLT2 à la surface ainsi qu'une forte expression intracellulaire. La prochaine étape a été de vérifier s'il y a internalisation du récepteur CysLT2 après stimulation avec son ligand. Nous avons obtenu une minime internalisation de $5.8 \pm 12.6\%$ à des temps allant jusqu'à 1 heure de stimulation. Toutefois, lorsque l'on stimule pendant plus de 2 heures, nous obtenons une augmentation de l'expression du récepteur CysLT2 à l'extérieur de la cellule par cytométrie de flux qui a aussi été montrée par microscopie confocale. L'internalisation moindre du récepteur CysLT2 comparée à celle du récepteur CysLT1 pourrait s'expliquer par une détection diminuée de l'internalisation à cause de l'externalisation du récepteur CysLT2. D'autres récepteurs possèdent également la capacité de s'externaliser à la surface cellulaire. Le récepteur de chimiokine CXCR1 chez les cellules T CD8+ humaines est localisé dans des vésicules intracellulaires qui colocalisent partiellement avec le marqueur de Golgi GM130 et le marqueur d'endosomes précoces EEA-1. Lorsqu'il y a activation des cellules T, l'expression du CXCR1 est régulée à la hausse à la surface cellulaire quelques minutes suivant cette activation (Gasser et al., 2005). Des études préliminaires dans notre laboratoire, chez les cellules primaires, ont récemment montré que l'expression de surface du récepteur CysLT2 était augmentée chez les lymphocytes et les monocytes suite à une stimulation de 4 heures au LTC₄ sans toutefois modifier l'expression à l'intérieur de ces cellules. Il serait aussi intéressant de vérifier ce qui se passe chez les cellules endothéliales ombilicales humaines (HUVEC), cellules qui expriment

exclusivement le récepteur CysLT2 (Sjostrom et al., 2003). Finalement, nous avons vérifié la fonctionnalité des récepteurs externalisés après 2 et 4 heures de prétraitement au LTC₄ via des essais inositol phosphates. Ainsi, nous avons obtenu une hausse de plus de 4 fois la production des inositol phosphates indiquant une plus grande quantité de récepteurs présents à la surface cellulaire.

Étant donné que nous observons des différences majeures au niveau du mouvement après stimulation des récepteurs CysLT1 et CysLT2 et que l'externalisation du récepteur CysLT2 est tardive, nous avons comparé la cinétique d'accumulation d'inositol phosphates des deux récepteurs. Nous avons obtenu un patron d'augmentation de production des inositol phosphates similaire pour les deux récepteurs atteignant un plateau après 3 heures de stimulation où l'on observe une saturation de la formation en inositol phosphates. Une seule différence à noter est que la production totale d'inositol phosphates à partir de 3 heures de stimulation est plus élevée chez les cellules 293LT1 que 293LT2. Plusieurs divergences au niveau caractéristique et fonctionnel des deux récepteurs pourraient expliquer la plus grande production d'inositol phosphates observée chez les cellules 293LT1. Après de longs temps de stimulation, les récepteurs CysLT2 exprimés à la surface pourraient être moins facilement resensibilisés que les récepteurs CysLT1 afin de pouvoir s'internaliser de nouveau et activer différentes voies de signalisation. Il se pourrait également que les niveaux d'expression des récepteurs ainsi que les types de protéines G activées puissent expliquer cette différence de production d'inositol phosphates. Dans un système de surexpression chez les cellules 293LT1, il y a plutôt activation de la sous-unité Gq/11 étant donné que la toxine de pertussis a peu

d'effet sur la mobilisation de calcium (Sarau et al., 1999). Mais si l'expression du CysLT1 est endogène, il y a aussi activation de protéines G sensibles à la toxine de pertussis (Saussy et al., 1989). Finalement, l'affinité pour le ligand pourrait aussi influencer sur la production d'inositol phosphates. Le LTD₄ est le ligand de haute affinité pour le récepteur CysLT1 quoique le LTC₄ et le LTD₄ ont la même affinité pour le récepteur CysLT2 (Heise et al., 2000; Nothacker et al., 2000). Le LTD₄ a été utilisé pour le récepteur CysLT1 tandis que le LTC₄ a été le ligand privilégié pour le récepteur CysLT2 étant donné que des essais luciférases réalisés dans notre laboratoire ont montré que le LTC₄ était plus puissant pour l'activation du récepteur CysLT2 que le LTD₄ (résultats non illustrés). Finalement, il serait possible que le LTD₄ soit plus puissant pour un type d'essai fonctionnel particulier, dans notre cas les essais inositol phosphates, ce qui expliquerait une plus faible production d'inositol phosphates chez les cellules 293LT2.

PERSPECTIVES

Plusieurs expériences devront être accomplies pour démystifier l'implication de tous les partenaires nécessaires à l'internalisation du récepteur CysLT1 ainsi que son routage intracellulaire. Il serait très intéressant notamment d'utiliser des ARNi de GRK, d'arrestines et de cavéoline afin de mieux déterminer le rôle de ces molécules dans l'internalisation du récepteur CysLT1. L'utilisation de mutants d'Arf6 va aussi nous aider à en savoir davantage sur comment le processus d'internalisation est régulé.

Certains détails restent encore à être précisés et élucidés concernant le récepteur CysLT2 car plusieurs expériences par immunofluorescence semblent montrer une hausse totale de l'expression du récepteur CysLT2 lorsque stimulé plus de 2 heures au LTC₄. Il reste à évaluer s'il y a bel et bien une hausse d'expression totale du récepteur dans la cellule et si tel est le cas si l'augmentation à la surface est supérieure à celle à l'intérieur de la cellule. L'élévation en ARNm et en protéines pourrait être évaluée respectivement par RT-PCR et immunobuvardage de type Western ou cytométrie de flux. Les raisons amenant cette augmentation d'expression sont inconnues pour l'instant et voici donc quelques spéculations. Un plasmide d'expression normale est habituellement intégré au génome de la cellule de manière aléatoire et l'endroit où il s'intègre peut influencer le taux de transcription du gène d'intérêt (Murnane et al., 1990; Wurm, 2004). Par exemple, l'intégration de plasmide dans de l'hétérochromatine inactive peut amener une expression faible ou absence du transgène. Dans notre cas, l'expression semble être plus faible au départ et augmente suite à des temps prolongés de stimulation avec le ligand. Il se pourrait qu'une stabilisation de l'ARNm induite par le ligand permette une meilleure

traduction ainsi qu'une plus grande production de protéines. Il serait farfelu et peu probable que le pCMV, promoteur du gène CysLT2 permettant une expression constitutive de la protéine, soit inductible par le ligand générant ainsi une plus grande production de protéines. Bref, il reste que ce phénomène d'augmentation du récepteur CysLT2 au niveau de la surface cellulaire demeure intrigant particulièrement de savoir comment ce processus est régulé et quelles molécules régulent le transport du récepteur CysLT2 de l'intérieur à la surface cellulaire. L'étude du récepteur CysLT2 n'en est encore qu'à ses débuts car il existe très peu d'études au niveau moléculaire dans la littérature.

Les propriétés de dimérisation des RCPG sont attribuées à un nombre croissant de RCPG. Par exemple, l'hétérodimérisation a notamment été démontrée chez les récepteurs opioïdes et chimiokines (Jordan and Devi, 1999; Mellado et al., 2001). Il y a peu d'évidence dans la littérature concernant l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation potentielle des récepteurs CysLT1 et CysLT2. Le groupe de Mellor a montré chez les mastocytes humains, cellules exprimant les récepteurs CysLT1 et CysLT2, en présence de MK571 un bloqueur du CysLT1, qu'il y a une production d'IL-5 qui résulterait de la stimulation par le BAYu9773 et non pas par les cysLTs. Ils ont suggéré que cet effet proviendrait d'une stimulation d'un hétérodimère CysLT1-CysLT2 étant inaccessible par le MK571 (Mellor et al., 2003). La dimérisation des CysLT1 et CysLT2 devra être confirmée sous peu notamment par des essais de BRET permettant d'étudier les interactions protéine-protéine in-vivo. La formation d'homo-hétérodimères pourrait jouer

un rôle important au niveau de la physiologie cellulaire par son influence sur la pharmacologie et la fonction des récepteurs.

CONCLUSIONS

Nous avons démontré que la localisation cellulaire des récepteurs CysLT1 et CysLT2 était très différente chez les cellules HEK293 exprimant de façon stable chacun des 2 récepteurs. À l'état basal, le récepteur CysLT1 est situé en grande majorité à la membrane plasmique tandis que le récepteur CysLT2 est légèrement exprimé à la membrane mais fortement exprimé à l'intérieur de la cellule. Les deux récepteurs ont des comportements différents post-stimulation. Le récepteur CysLT1 s'internalise fortement à 60-70% et de façon soutenu dans le temps après une stimulation avec son agoniste, le LTD₄. Or, le récepteur CysLT2 s'internalise faiblement lorsque stimulé pendant moins de 1 heure mais on observe une augmentation de l'expression de surface du récepteur CysLT2 après de plus long temps de stimulation allant jusqu'à 4 heures avec son agoniste privilégié, le LTC₄. Des expériences de production d'inositol phosphates ont également montré que les récepteurs CysLT2 à la surface après les longs temps de stimulation sont fonctionnels.

Nos expériences suggèrent que l'internalisation du récepteur CysLT1 est indépendante des arrestines, des GRK 2, 5 et 6 et de la caséine kinase 2. Tandis que la caséine kinase 1 et les protéines kinases C sont nécessaires pour permettre l'internalisation de ce récepteur qui semblent être en grande partie dépendante des vésicules de clathrine et de l'action de la dynamine. Nos données suggèrent un rôle des radeaux lipidiques pour l'internalisation du récepteur tandis que les caveolae ne sembleraient pas être impliquées dans ce processus. Nous avons aussi démontré qu'un réseau d'actine intact et fonctionnel est important pour l'internalisation du récepteur CysLT1.

REMERCIEMENTS

Je tiens premièrement à remercier les Dre Jana Stankova et Dr Marek Rola-Pleszczynski de m'avoir accueillie dans leur laboratoire de recherche, pour leur soutien, leurs encouragements, les nombreux conseils et suggestions apportés tout au long du projet. Merci également de m'avoir permis de participer à plusieurs congrès provinciaux et même internationaux.

Un gros merci à tous mes collègues de laboratoire pour leurs conseils, leur soutien moral, leur amitié, les nombreux services rendus et sans qui travailler en laboratoire n'aurait pas été aussi plaisant. Je tiens donc à remercier Caroline Poisson, Simon Rollin, Karine Lambert, Ynuk Bossé, Nermine Maghrabi, Sylvie Turcotte, Charles Thompson, Jean-François Larrivée, Geneviève Hamel-Côté, Steeve Veronneau, Kathleen Lafortune, Josée Lamoureux, Maryse Thivierge et Jenny Noël.

Un merci particulier à Dr Christian LeGouill d'avoir été mon professeur privé au début de ma maîtrise dans le laboratoire et de m'avoir enseigné les arts techniques de la biologie moléculaire. Merci à Sylvie Turcotte ainsi que Dr Leonid Volkov pour l'initiation aux techniques de cytométrie de flux ainsi que de microscopie confocale qui ont été nécessaires pour réaliser cette maîtrise. Un gros merci également à Dr Charles Thompson (d'avoir réalisé les lignées de cellules stables) ainsi qu'à Dr Ynuk Bossé pour toutes les discussions scientifiques enrichissantes et les conseils apportés. Merci à Steeve Veronneau pour son aide précieuse en biologie moléculaire. Un gros merci à Jean-

François Larrivée de poursuivre mes projets de recherche notamment par l'étude du routage intracellulaire du récepteur CysLT1 ainsi que l'externalisation du récepteur CysLT2.

Un gros merci aux professeurs Dr Jean-Luc Parent ainsi que Dr Phillippe Sarret qui ont gentiment accepté de lire et corriger ce mémoire de maîtrise.

Finalement, je tiens à remercier énormément ma famille et mes amis de m'avoir soutenue moralement et encouragée tout au long de ces études supérieures. Merci à mon amoureux Olivier Caron-Lizotte pour son grand amour, sa compréhension et sa patience notamment lorsque mes journées de laboratoire étaient beaucoup plus longues que prévu. Finalement, merci à mon chat, Roxy, pour son affection et pour m'avoir tenue compagnie lors de mes pratiques de séminaire et lors de la rédaction de mon mémoire.

ANNEXE 1

PBS25X

200g NaCl

5g KCl

36g Na₂HPO₄

6g KH₂PO₄

Mettre le tout dans 800ml d'eau et ajuster le pH à 6.4. Compléter le volume à 1L et stériliser.

DPBS1X

Poudre pour solution DPBS

2.16g/L Na₂HPO₄

1g/L D-glucose

0.05g/L CaCl₂

Substrat activé pour ELISA

33ml H₂O

17.13ml solution sodium dibasique 0.2M

16.2ml acide citrique

1 pilule d'OPD (20mg)

20µl H₂O₂ -juste avant d'ajouter le substrat aux cellules-

Solution Ammonium formate 1.5M pour essais inositol phosphates

94.56g ammonium formate

4.24ml acide formique (88%)

Ajuster à 1L avec de l'eau

Solution ammonium formate 20mM pour essais inositol phosphates

4.24ml acide formique (88%)

Ajuster à 1L avec de l'eau, enlever 13.3ml de la solution d'acide formique et ajouter 13.3ml de la solution Ammonium formate 1.5M

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, M.D., S.E. Celniker, R.A. Holt, C.A. Evans, J.D. Gocayne, P.G. Amanatides, S.E. Scherer, P.W. Li, R.A. Hoskins, R.F. Galle, R.A. George, S.E. Lewis, S. Richards, M. Ashburner, S.N. Henderson, G.G. Sutton, J.R. Wortman, M.D. Yandell, Q. Zhang, L.X. Chen, R.C. Brandon, Y.H. Rogers, R.G. Blazej, M. Champe, B.D. Pfeiffer, K.H. Wan, C. Doyle, E.G. Baxter, G. Helt, C.R. Nelson, G.L. Gabor, J.F. Abril, A. Agbayani, H.J. An, C. Andrews-Pfannkoch, D. Baldwin, R.M. Ballew, A. Basu, J. Baxendale, L. Bayraktaroglu, E.M. Beasley, K.Y. Beeson, P.V. Benos, B.P. Berman, D. Bhandari, S. Bolshakov, D. Borkova, M.R. Botchan, J. Bouck, P. Brokstein, P. Brottier, K.C. Burtis, D.A. Busam, H. Butler, E. Cadieu, A. Center, I. Chandra, J.M. Cherry, S. Cawley, C. Dahlke, L.B. Davenport, P. Davies, B. de Pablos, A. Delcher, Z. Deng, A.D. Mays, I. Dew, S.M. Dietz, K. Dodson, L.E. Doup, M. Downes, S. Dugan-Rocha, B.C. Dunkov, P. Dunn, K.J. Durbin, C.C. Evangelista, C. Ferraz, S. Ferriera, W. Fleischmann, C. Fosler, A.E. Gabrielian, N.S. Garg, W.M. Gelbart, K. Glasser, A. Glodek, F. Gong, J.H. Gorrell, Z. Gu, P. Guan, M. Harris, N.L. Harris, D. Harvey, T.J. Heiman, J.R. Hernandez, J. Houck, D. Hostin, K.A. Houston, T.J. Howland, M.H. Wei, C. Ibegwam, et al. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287:2185-95.
- Ahmed, T., D.W. Greenblatt, S. Birch, B. Marchette, and A. Wanner. 1981. Abnormal mucociliary transport in allergic patients with antigen-induced bronchospasm: role of slow reacting substance of anaphylaxis. *Am Rev Respir Dis*. 124:110-4.
- Alberts, B., et al. 2002. Molecular biology of the cell. Garland Science, New York.
- Allen, S.P., A.P. Sampson, P.J. Piper, A.H. Chester, S.K. Ohri, and M.H. Yacoub. 1993. Enhanced excretion of urinary leukotriene E4 in coronary artery disease and after coronary artery bypass surgery. *Coron Artery Dis*. 4:899-904.
- Anborgh, P.H., J.L. Seachrist, L.B. Dale, and S.S. Ferguson. 2000. Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. *Mol Endocrinol*. 14:2040-53.
- Anderson, H.A., Y. Chen, and L.C. Norkin. 1996. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell*. 7:1825-34.
- Anderson, M.E., R.D. Allison, and A. Meister. 1982. Interconversion of leukotrienes catalyzed by purified gamma-glutamyl transpeptidase: concomitant formation of leukotriene D4 and gamma-glutamyl amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79:1088-91.

- Aoki, T., R. Nomura, and T. Fujimoto. 1999. Tyrosine phosphorylation of caveolin-1 in the endothelium. *Exp Cell Res.* 253:629-36.
- Arakawa, H., J. Lotvall, I. Kawikova, C.G. Lofdahl, and B.E. Skoogh. 1993. Leukotriene D4- and prostaglandin F2 alpha-induced airflow obstruction and airway plasma exudation in guinea-pig: role of thromboxane and its receptor. *Br J Pharmacol.* 110:127-32.
- Asano, T., M. Ui, and N. Ogasawara. 1985. Prevention of the agonist binding to gamma-aminobutyric acid B receptors by guanine nucleotides and islet-activating protein, pertussis toxin, in bovine cerebral cortex. Possible coupling of the toxin-sensitive GTP-binding proteins to receptors. *J Biol Chem.* 260:12653-8.
- Bach, M.K., J.R. Brashler, C.D. Brooks, and A.J. Neerken. 1979. Slow reacting substances: comparison of some properties of human lung SRS-A and two distinct fractions from ionophore-induced rat mononuclear cell SRS. *J Immunol.* 122:160-5.
- Barnes, N.C., P.J. Piper, and J.F. Costello. 1984. Comparative effects of inhaled leukotriene C4, leukotriene D4, and histamine in normal human subjects. *Thorax.* 39:500-4.
- Benmerah, A., B. Begue, A. Dautry-Varsat, and N. Cerf-Bensussan. 1996. The ear of alpha-adaptin interacts with the COOH-terminal domain of the Eps 15 protein. *J Biol Chem.* 271:12111-6.
- Benmerah, A., and C. Lamaze. 2002. Endocytose : chaque voie compte! *Medecine Sciences.* 18:1126-36.
- Benovic, J.L., R.H. Strasser, M.G. Caron, and R.J. Lefkowitz. 1986. Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:2797-801.
- Bigby, T.D., C.R. Hodulik, K.C. Arden, and L. Fu. 1996. Molecular cloning of the human leukotriene C4 synthase gene and assignment to chromosome 5q35. *Mol Med.* 2:637-46.
- Bisgaard, H., S. Groth, and F. Madsen. 1985a. Bronchial hyperreactivity to leucotriene D4 and histamine in exogenous asthma. *Br Med J (Clin Res Ed).* 290:1468-71.
- Bisgaard, H., A. Lerche, and J.K. Kristensen. 1985b. Leukotriene- and histamine-induced increases in vascular permeability and interstitial transport in the skin. *J Invest Dermatol.* 84:427-9.

- Bisgaard, H., P. Olsson, and M. Bende. 1986. Effect of leukotriene D4 on nasal mucosal blood flow, nasal airway resistance and nasal secretion in humans. *Clin Allergy*. 16:289-97.
- Bisgaard, H., and M. Pedersen. 1987. SRS-A leukotrienes decrease the activity of human respiratory cilia. *Clin Allergy*. 17:95-103.
- Bloomquist, E.I., and R.M. Kream. 1990. Release of substance P from guinea pig trachea leukotriene D4. *Exp Lung Res*. 16:645-59.
- Bohm, S.K., E.F. Grady, and N.W. Bunnett. 1997. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J*. 322 (Pt 1):1-18.
- Boll, W., H. Ohno, Z. Songyang, I. Rapoport, L.C. Cantley, J.S. Bonifacino, and T. Kirchhausen. 1996. Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. *Embo J*. 15:5789-95.
- Bonifacino, J.S., and E.C. Dell'Angelica. 1999. Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol*. 145:923-6.
- Borgeat, P., M. Hamberg, and B. Samuelsson. 1976. Transformation of arachidonic acid and homo-gamma-linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Monohydroxy acids from novel lipoxygenases. *J Biol Chem*. 251:7816-20.
- Brightling, C.E., R. Ward, G. Woltmann, P. Bradding, J.R. Sheller, R. Dworski, and I.D. Pavord. 2000. Induced sputum inflammatory mediator concentrations in eosinophilic bronchitis and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 162:878-82.
- Brock, T.G., R.W. McNish, and M. Peters-Golden. 1995. Translocation and leukotriene synthetic capacity of nuclear 5-lipoxygenase in rat basophilic leukemia cells and alveolar macrophages. *J Biol Chem*. 270:21652-8.
- Brocklehurst, W.E. 1953. Occurrence of an unidentified substance during anaphylactic shock in cavy lung. *J Physiol*. 120:16P-17P.
- Brocklehurst, W.E. 1962. Slow reacting substance and related compounds. *Prog Allergy*. 6:539-58.
- Brown, V.I., and M.I. Greene. 1991. Molecular and cellular mechanisms of receptor-mediated endocytosis. *DNA Cell Biol*. 10:399-409.
- Bruijnzeel, P.L., J.C. Virchow, Jr., S. Rihs, C. Walker, and J. Verhagen. 1993. Lack of increased numbers of low-density eosinophils in the circulation of asthmatic individuals. *Clin Exp Allergy*. 23:261-9.

- Bruns, R.F., W.J. Thomsen, and T.A. Pugsley. 1983. Binding of leukotrienes C4 and D4 to membranes from guinea pig lung: regulation by ions and guanine nucleotides. *Life Sci.* 33:645-53.
- Budd, D.C., J.E. McDonald, and A.B. Tobin. 2000. Phosphorylation and regulation of a Gq/11-coupled receptor by casein kinase 1alpha. *J Biol Chem.* 275:19667-75.
- Busse, W.W., and J.B. Sedgwick. 1992. Eosinophils in asthma. *Ann Allergy.* 68:286-90.
- Capra, V. 2004. Molecular and functional aspects of human cysteinyl leukotriene receptors. *Pharmacol Res.* 50:1-11.
- Capra, V., S. Ravasi, M.R. Accomazzo, S. Citro, M. Grimoldi, M.P. Abbracchio, and G.E. Rovati. 2005. CysLT1 receptor is a target for extracellular nucleotide-induced heterologous desensitization: a possible feedback mechanism in inflammation. *J Cell Sci.* 118:5625-36.
- Capra, V., M.D. Thompson, A. Sala, D.E. Cole, G. Folco, and G.E. Rovati. 2006. Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: Critical update and emerging trends. *Med Res Rev.*
- Carry, M., V. Korley, J.T. Willerson, L. Weigelt, A.W. Ford-Hutchinson, and P. Tagari. 1992. Increased urinary leukotriene excretion in patients with cardiac ischemia. In vivo evidence for 5-lipoxygenase activation. *Circulation.* 85:230-6.
- Carter, B.Z., Z.Z. Shi, R. Barrios, and M.W. Lieberman. 1998. gamma-glutamyl leukotrienase, a gamma-glutamyl transpeptidase gene family member, is expressed primarily in spleen. *J Biol Chem.* 273:28277-85.
- Chavrier, P., R.G. Parton, H.P. Hauri, K. Simons, and M. Zerial. 1990. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell.* 62:317-29.
- Chen, C.Y., S.B. Dion, C.M. Kim, and J.L. Benovic. 1993. Beta-adrenergic receptor kinase. Agonist-dependent receptor binding promotes kinase activation. *J Biol Chem.* 268:7825-31.
- Chen, H., S. Fre, V.I. Slepnev, M.R. Capua, K. Takei, M.H. Butler, P.P. Di Fiore, and P. De Camilli. 1998. Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature.* 394:793-7.
- Chen, Z., D.J. Dupre, C. Le Gouill, M. Rola-Pleszczynski, and J. Stankova. 2002. Agonist-induced internalization of the platelet-activating factor receptor is dependent on arrestins but independent of G-protein activation. Role of the C terminus and the (D/N)PXXY motif. *J Biol Chem.* 277:7356-62.

- Chen, Z., R. Gaudreau, C. Le Gouill, M. Rola-Pleszczynski, and J. Stankova. 2004. Agonist-induced internalization of leukotriene B(4) receptor 1 requires G-protein-coupled receptor kinase 2 but not arrestins. *Mol Pharmacol*. 66:377-86.
- Christie, P.E., and W.R. Henderson, Jr. 2002. Lipid inflammatory mediators: leukotrienes, prostaglandins, platelet-activating factor. *Clin Allergy Immunol*. 16:233-54.
- Christie, P.E., P. Tagari, A.W. Ford-Hutchinson, S. Charlesson, P. Chee, J.P. Arm, and T.H. Lee. 1991. Urinary leukotriene E4 concentrations increase after aspirin challenge in aspirin-sensitive asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis*. 143:1025-9.
- Christopoulos, A., and T. Kenakin. 2002. G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev*. 54:323-74.
- Chuang, T.T., L. Iacovelli, M. Sallese, and A. De Blasi. 1996. G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol Sci*. 17:416-21.
- Chun, M., U.K. Liyanage, M.P. Lisanti, and H.F. Lodish. 1994. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:11728-32.
- Claing, A. 2004. Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis by ARF6 GTP-binding proteins. *Biochem Cell Biol*. 82:610-7.
- Clark, J.D., A.R. Schievella, E.A. Nalefski, and L.L. Lin. 1995. Cytosolic phospholipase A2. *J Lipid Mediat Cell Signal*. 12:83-117.
- Consortium, T.C.e.S. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*. 282:2012-8.
- Cookson, W. 1999. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature*. 402:B5-11.
- Corey, E.J., H. Niwa, J.R. Falck, C. Mioskowski, Y. Arai, and A. Marfat. 1980. Recent studies on the chemical synthesis of eicosanoids. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res*. 6:19-25.
- Cotlin, L.F., M.A. Siddiqui, F. Simpson, and J.F. Collawn. 1999. Casein kinase II activity is required for transferrin receptor endocytosis. *J Biol Chem*. 274:30550-6.
- Couet, J., S. Li, T. Okamoto, T. Ikezu, and M.P. Lisanti. 1997. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem*. 272:6525-33.

- Cowburn, A.S., K. Sladek, J. Soja, L. Adamek, E. Nizankowska, A. Szczeklik, B.K. Lam, J.F. Penrose, F.K. Austen, S.T. Holgate, and A.P. Sampson. 1998. Overexpression of leukotriene C4 synthase in bronchial biopsies from patients with aspirin-intolerant asthma. *J Clin Invest.* 101:834-46.
- Dahlen, S.E. 2006. Treatment of asthma with antileukotrienes: first line or last resort therapy? *Eur J Pharmacol.* 533:40-56.
- Dahlen, S.E., P. Hedqvist, S. Hammarstrom, and B. Samuelsson. 1980. Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature.* 288:484-6.
- Damm, E.M., L. Pelkmans, J. Kartenbeck, A. Mezzacasa, T. Kurzchalia, and A. Helenius. 2005. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol.* 168:477-88.
- Davies, D.E., J. Wicks, R.M. Powell, S.M. Puddicombe, and S.T. Holgate. 2003. Airway remodeling in asthma: new insights. *J Allergy Clin Immunol.* 111:215-25; quiz 226.
- de Pater-Huijsen, F.L., M. Pompen, H.M. Jansen, and T.A. Out. 1997. Products from mast cells influence T lymphocyte proliferation and cytokine production--relevant to allergic asthma? *Immunol Lett.* 57:47-51.
- Dietzen, D.J., W.R. Hastings, and D.M. Lublin. 1995. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem.* 270:6838-42.
- Dixon, R.A., R.E. Diehl, E. Opas, E. Rands, P.J. Vickers, J.F. Evans, J.W. Gillard, and D.K. Miller. 1990. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature.* 343:282-4.
- Drab, M., P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, C. Lindschau, F. Mende, F.C. Luft, A. Schedl, H. Haller, and T.V. Kurzchalia. 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science.* 293:2449-52.
- D'Souza-Schorey, C., and P. Chavrier. 2006. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:347-58.
- Dupre, D.J., C. Le Gouill, D. Gingras, M. Rola-Pleszczynski, and J. Stankova. 2004. Inverse agonist activity of selected ligands of the cysteinyl-leukotriene receptor 1. *J Pharmacol Exp Ther.* 309:102-8.
- Ebina, M., H. Yaegashi, R. Chiba, T. Takahashi, M. Motomiya, and M. Tanemura. 1990. Hyperreactive site in the airway tree of asthmatic patients revealed by thickening of bronchial muscles. A morphometric study. *Am Rev Respir Dis.* 141:1327-32.

- Elberg, G., R.W. Hipkin, and A. Schonbrunn. 2002. Homologous and heterologous regulation of somatostatin receptor 2. *Mol Endocrinol.* 16:2502-14.
- Erjefalt, J.S., L. Greiff, M. Andersson, E. Matsson, H. Petersen, M. Linden, T. Ansari, P.K. Jeffery, and C.G. Persson. 1999. Allergen-induced eosinophil cytotoxicity is a primary mechanism for granule protein release in human upper airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 160:304-12.
- Espinosa, K., Y. Bosse, J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2003. CysLT1 receptor upregulation by TGF-beta and IL-13 is associated with bronchial smooth muscle cell proliferation in response to LTD4. *J Allergy Clin Immunol.* 111:1032-40.
- Estell, J.L., B. Yusta, and D.J. Drucker. 2004. Lipid raft-dependent glucagon-like peptide-2 receptor trafficking occurs independently of agonist-induced desensitization. *Mol Biol Cell.* 15:3673-87.
- Evans, J.F., P. Dupuis, and A.W. Ford-Hutchinson. 1985. Purification and characterisation of leukotriene A4 hydrolase from rat neutrophils. *Biochim Biophys Acta.* 840:43-50.
- Feldberg, W., H.F. Holden, and C.H. Kellaway. 1938. The formation of lysocithin and of a muscle-stimulating substance by snake venoms. *J Physiol.* 94:232-248.
- Feldberg, W., and C.H. Kellaway. 1938. Liberation of histamine and formation of lysocithin-like substances by cobra venom. *J Physiol.* 94:187-226.
- Fenteany, G., and M. Glogauer. 2004. Cytoskeletal remodeling in leukocyte function. *Curr Opin Hematol.* 11:15-24.
- Ferguson, S.S. 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev.* 53:1-24.
- Ferguson, S.S., W.E. Downey, 3rd, A.M. Colapietro, L.S. Barak, L. Menard, and M.G. Caron. 1996. Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science.* 271:363-6.
- Figuerola, D.J., L. Borish, D. Baramki, G. Philip, C.P. Austin, and J.F. Evans. 2003. Expression of cysteinyl leukotriene synthetic and signalling proteins in inflammatory cells in active seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy.* 33:1380-8.
- Figuerola, D.J., R.M. Breyer, S.K. Defoe, S. Kargman, B.L. Daugherty, K. Waldburger, Q. Liu, M. Clements, Z. Zeng, G.P. O'Neill, T.R. Jones, K.R. Lynch, C.P. Austin, and J.F. Evans. 2001. Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *Am J Respir Crit Care Med.* 163:226-33.

- Folco, G., G. Rossoni, C. Buccellati, F. Berti, J. Macclouf, and A. Sala. 2000. Leukotrienes in cardiovascular diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 161:S112-6.
- Fredriksson, R., M.C. Lagerstrom, L.G. Lundin, and H.B. Schioth. 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 63:1256-72.
- Gagnon, A.W., L. Kallal, and J.L. Benovic. 1998. Role of clathrin-mediated endocytosis in agonist-induced down-regulation of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 273:6976-81.
- Gaidarov, I., F. Santini, R.A. Warren, and J.H. Keen. 1999. Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nat Cell Biol.* 1:1-7.
- Galbiati, F., J.A. Engelman, D. Volonte, X.L. Zhang, C. Minetti, M. Li, H. Hou, Jr., B. Kneitz, W. Edelmann, and M.P. Lisanti. 2001a. Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J Biol Chem.* 276:21425-33.
- Galbiati, F., B. Razani, and M.P. Lisanti. 2001b. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell.* 106:403-11.
- Galli, S.J., J. Kalesnikoff, M.A. Grimbaldston, A.M. Piliponsky, C.M. Williams, and M. Tsai. 2005. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol.* 23:749-86.
- Gasser, O., A. Missiou, C. Eken, and C. Hess. 2005. Human CD8+ T cells store CXCR1 in a distinct intracellular compartment and up-regulate it rapidly to the cell surface upon activation. *Blood.* 106:3718-24.
- Gibson, P.G., J.L. Simpson, and N. Saltos. 2001. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest.* 119:1329-36.
- Goodman, O.B., Jr., J.G. Krupnick, V.V. Gurevich, J.L. Benovic, and J.H. Keen. 1997. Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J Biol Chem.* 272:15017-22.
- Goodman, O.B., Jr., J.G. Krupnick, F. Santini, V.V. Gurevich, R.B. Penn, A.W. Gagnon, J.H. Keen, and J.L. Benovic. 1996. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature.* 383:447-50.
- Gorvel, J.P., P. Chavrier, M. Zerial, and J. Gruenberg. 1991. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell.* 64:915-25.

- Green, S.A., M.P. Malice, W. Tanaka, C.A. Tozzi, and T.F. Reiss. 2004. Increase in urinary leukotriene LTE₄ levels in acute asthma: correlation with airflow limitation. *Thorax*. 59:100-4.
- Griffoni, C., E. Spisni, S. Santi, M. Riccio, T. Guarnieri, and V. Tomasi. 2000. Knockdown of caveolin-1 by antisense oligonucleotides impairs angiogenesis in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 276:756-61.
- Gronroos, E., A. Schippert, M. Engstrom, and A. Sjolander. 1995. The regulation of leukotriene D₄-induced calcium influx in human epithelial cells involves protein tyrosine phosphorylation. *Cell Calcium*. 17:177-86.
- Haasemann, M., J. Cartaud, W. Muller-Esterl, and I. Dunia. 1998. Agonist-induced redistribution of bradykinin B₂ receptor in caveolae. *J Cell Sci*. 111 (Pt 7):917-28.
- Haga, K., K. Kameyama, T. Haga, U. Kikkawa, K. Shiozaki, and H. Uchiyama. 1996. Phosphorylation of human m1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 and protein kinase C. *J Biol Chem*. 271:2776-82.
- Hanyaloglu, A.C., M. Vrecl, K.M. Kroeger, L.E. Miles, H. Qian, W.G. Thomas, and K.A. Eidne. 2001. Casein kinase II sites in the intracellular C-terminal domain of the thyrotropin-releasing hormone receptor and chimeric gonadotropin-releasing hormone receptors contribute to beta-arrestin-dependent internalization. *J Biol Chem*. 276:18066-74.
- Haribabu, B., R.M. Richardson, I. Fisher, S. Sozzani, S.C. Peiper, R. Horuk, H. Ali, and R. Snyderman. 1997. Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *J Biol Chem*. 272:28726-31.
- Hartung, A., K. Bitton-Worms, M.M. Rechtman, V. Wenzel, J.H. Boergermann, S. Hassel, Y.I. Henis, and P. Knaus. 2006. Different routes of bone morphogenic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Mol Cell Biol*. 26:7791-805.
- Hay, D.W., T.J. Torphy, and B.J. Undem. 1995. Cysteinyl leukotrienes in asthma: old mediators up to new tricks. *Trends Pharmacol Sci*. 16:304-9.
- Heise, C.E., B.F. O'Dowd, D.J. Figueroa, N. Sawyer, T. Nguyen, D.S. Im, R. Stocco, J.N. Bellefeuille, M. Abramovitz, R. Cheng, D.L. Williams, Jr., Z. Zeng, Q. Liu, L. Ma, M.K. Clements, N. Coulombe, Y. Liu, C.P. Austin, S.R. George, G.P. O'Neill, K.M. Metters, K.R. Lynch, and J.F. Evans. 2000. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem*. 275:30531-6.

- Henderson, W.R., Jr. 1994. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med.* 121:684-97.
- Henley, J.R., E.W. Krueger, B.J. Oswald, and M.A. McNiven. 1998. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol.* 141:85-99.
- Heuser, J.E., and R.G. Anderson. 1989. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol.* 108:389-400.
- Higashi, N., M. Taniguchi, H. Mita, T. Ishii, and K. Akiyama. 2003. Nasal blockage and urinary leukotriene E4 concentration in patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergy.* 58:476-80.
- Hishinuma, T., N. Suzuki, S. Aiba, H. Tagami, and M. Mizugaki. 2001. Increased urinary leukotriene E4 excretion in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 144:19-23.
- Hofmann, M.W., S. Honing, D. Rodionov, B. Dobberstein, K. von Figura, and O. Bakke. 1999. The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J Biol Chem.* 274:36153-8.
- Holgate, S.T., M. Peters-Golden, R.A. Panettieri, and W.R. Henderson, Jr. 2003. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* 111:S18-34; discussion S34-6.
- Hua, X.Y., S.E. Dahlen, J.M. Lundberg, S. Hammarstrom, and P. Hedqvist. 1985. Leukotrienes C4, D4 and E4 cause widespread and extensive plasma extravasation in the guinea pig. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 330:136-41.
- Ishizaka, N., K.K. Griendling, B. Lassegue, and R.W. Alexander. 1998. Angiotensin II type 1 receptor: relationship with caveolae and caveolin after initial agonist stimulation. *Hypertension.* 32:459-66.
- Ito, K., T. Haga, J. Lameh, and W. Sadee. 1999. Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 or 5. *Eur J Biochem.* 260:112-9.
- Johnson, H.G., and M.L. McNee. 1983. Secretagogue responses of leukotriene C4, D4: comparison of potency in canine trachea in vivo. *Prostaglandins.* 25:237-43.
- Johnson, M.S., D.N. Robertson, P.J. Holland, E.M. Lutz, and R. Mitchell. 2006. Role of the conserved NPxxY motif of the 5-HT2A receptor in determining selective interaction with isoforms of ADP-ribosylation factor (ARF). *Cell Signal.* 18:1793-800.

- Jones, T.R., M. Labelle, M. Belley, E. Champion, L. Charette, J. Evans, A.W. Ford-Hutchinson, J.Y. Gauthier, A. Lord, P. Masson, and et al. 1995. Pharmacology of montelukast sodium (Singulair), a potent and selective leukotriene D4 receptor antagonist. *Can J Physiol Pharmacol.* 73:191-201.
- Jordan, B.A., and L.A. Devi. 1999. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature.* 399:697-700.
- Kaksonen, M., C.P. Toret, and D.G. Drubin. 2006. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:404-14.
- Kellaway, C.H., and E.R. Trethewie. 1940. The liberation of a slow reacting smooth-muscle stimulating substance in anaphylaxis. *Q. J. Exp. Physiol.* 30:121-145.
- Kifor, O., R. Diaz, R. Butters, I. Kifor, and E.M. Brown. 1998. The calcium-sensing receptor is localized in caveolin-rich plasma membrane domains of bovine parathyroid cells. *J Biol Chem.* 273:21708-13.
- Kim, J.H., P. Tagari, A.M. Griffiths, A. Ford-Hutchinson, C. Smith, and P.M. Sherman. 1995. Levels of peptidoleukotriene E4 are elevated in active Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 20:403-7.
- Kimura, K., E. Noguchi, M. Shibasaki, T. Arinami, Y. Yokouchi, K. Takeda, K. Yamakawa-Kobayashi, A. Matsui, and H. Hamaguchi. 1999. Linkage and association of atopic asthma to markers on chromosome 13 in the Japanese population. *Hum Mol Genet.* 8:1487-90.
- Kirchhausen, T. 1999. Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15:705-32.
- Kirchhausen, T. 2000. Clathrin. *Annu Rev Biochem.* 69:699-727.
- Kirkham, M., and R.G. Parton. 2005a. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta.* 1746:349-63.
- Kirkham, M., and R.G. Parton. 2005b. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta.* 1745:273-86.
- Krell, R.D., D. Aharony, C.K. Buckner, R.A. Keith, E.J. Kusner, D.W. Snyder, P.R. Bernstein, V.G. Matassa, Y.K. Yee, F.J. Brown, and et al. 1990. The preclinical pharmacology of ICI 204,219. A peptide leukotriene antagonist. *Am Rev Respir Dis.* 141:978-87.

- Kroeze, W.K., D.J. Sheffler, and B.L. Roth. 2003. G-protein-coupled receptors at a glance. *J Cell Sci.* 116:4867-9.
- Krueger, K.M., Y. Daaka, J.A. Pitcher, and R.J. Lefkowitz. 1997. The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem.* 272:5-8.
- Krupnick, J.G., and J.L. Benovic. 1998. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 38:289-319.
- Krupnick, J.G., F. Santini, A.W. Gagnon, J.H. Keen, and J.L. Benovic. 1997. Modulation of the arrestin-clathrin interaction in cells. Characterization of beta-arrestin dominant-negative mutants. *J Biol Chem.* 272:32507-12.
- Labat, C., J.L. Ortiz, X. Norel, I. Gorenne, J. Verley, T.S. Abram, N.J. Cuthbert, S.R. Tudhope, P. Norman, P. Gardiner, and et al. 1992. A second cysteinyl leukotriene receptor in human lung. *J Pharmacol Exp Ther.* 263:800-5.
- Lafer, E.M. 2002. Clathrin-protein interactions. *Traffic.* 3:513-20.
- Laitinen, L.A., A. Laitinen, T. Haahtela, V. Vilkkä, B.W. Spur, and T.H. Lee. 1993. Leukotriene E4 and granulocytic infiltration into asthmatic airways. *Lancet.* 341:989-90.
- Lam, B.K., W.F. Owen, Jr., K.F. Austen, and R.J. Soberman. 1989. The identification of a distinct export step following the biosynthesis of leukotriene C4 by human eosinophils. *J Biol Chem.* 264:12885-9.
- Lam, B.K., J.F. Penrose, G.J. Freeman, and K.F. Austen. 1994. Expression cloning of a cDNA for human leukotriene C4 synthase, an integral membrane protein conjugating reduced glutathione to leukotriene A4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:7663-7.
- Lam, S., H. Chan, J.C. LeRiche, M. Chan-Yeung, and H. Salari. 1988. Release of leukotrienes in patients with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 81:711-7.
- Lancet, T. 2006. A plea to abandon asthma as a disease concept. *Lancet.* 368:705.
- Laporte, S.A., R.H. Oakley, J.A. Holt, L.S. Barak, and M.G. Caron. 2000. The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem.* 275:23120-6.
- Laroche, G., M.D. Rochdi, S.A. Laporte, and J.L. Parent. 2005. Involvement of actin in agonist-induced endocytosis of the G protein-coupled receptor for thromboxane

- A2: overcoming of actin disruption by arrestin-3 but not arrestin-2. *J Biol Chem.* 280:23215-24.
- Lazari, M.F., X. Liu, K. Nakamura, J.L. Benovic, and M. Ascoli. 1999. Role of G protein-coupled receptor kinases on the agonist-induced phosphorylation and internalization of the follitropin receptor. *Mol Endocrinol.* 13:866-78.
- Le Gouill, C., J.L. Parent, M. Rola-Pleszczynski, and J. Stankova. 1997. Structural and functional requirements for agonist-induced internalization of the human platelet-activating factor receptor. *J Biol Chem.* 272:21289-95.
- Lee, C.W., R.A. Lewis, E.J. Corey, and K.F. Austen. 1983. Conversion of leukotriene D4 to leukotriene E4 by a dipeptidase released from the specific granule of human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology.* 48:27-35.
- Lee, D.K. 2004. Urinary leukotriene LTE4 levels in non-responders to antileukotriene therapy. *Thorax.* 59:727; author reply 727.
- Lee, K.B., R. Pals-Rylaarsdam, J.L. Benovic, and M.M. Hosey. 1998. Arrestin-independent internalization of the m1, m3, and m4 subtypes of muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem.* 273:12967-72.
- Leier, I., G. Jedlitschky, U. Buchholz, S.P. Cole, R.G. Deeley, and D. Keppler. 1994. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem.* 269:27807-10.
- Lewis, M.A., S. Mong, R.L. Vessella, and S.T. Crooke. 1985. Identification and characterization of leukotriene D4 receptors in adult and fetal human lung. *Biochem Pharmacol.* 34:4311-7.
- Lewis, M.A., S. Mong, R.L. Vessella, G.K. Hogaboom, H.L. Wu, and S.T. Crooke. 1984. Identification of specific binding sites for leukotriene C4 in human fetal lung. *Prostaglandins.* 27:961-74.
- Li, S., R. Seitz, and M.P. Lisanti. 1996. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J Biol Chem.* 271:3863-8.
- Lisanti, M.P., Z.L. Tang, and M. Sargiacomo. 1993. Caveolin forms a hetero-oligomeric protein complex that interacts with an apical GPI-linked protein: implications for the biogenesis of caveolae. *J Cell Biol.* 123:595-604.
- Liu, P., M. Rudick, and R.G. Anderson. 2002. Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem.* 277:41295-8.

- Lobie, P.E., R. Sadir, R. Graichen, H.C. Mertani, and G. Morel. 1999. Caveolar internalization of growth hormone. *Exp Cell Res.* 246:47-55.
- Lohse, M.J., J.L. Benovic, J. Codina, M.G. Caron, and R.J. Lefkowitz. 1990. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science.* 248:1547-50.
- Lynch, K.R., G.P. O'Neill, Q. Liu, D.S. Im, N. Sawyer, K.M. Metters, N. Coulombe, M. Abramovitz, D.J. Figueroa, Z. Zeng, B.M. Connolly, C. Bai, C.P. Austin, A. Chateaneuf, R. Stocco, G.M. Greig, S. Kargman, S.B. Hooks, E. Hosfield, D.L. Williams, Jr., A.W. Ford-Hutchinson, C.T. Caskey, and J.F. Evans. 1999. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature.* 399:789-93.
- Macfarlane, A.J., R. Dworski, J.R. Sheller, I.D. Pavord, A.B. Kay, and N.C. Barnes. 2000. Sputum cysteinyl leukotrienes increase 24 hours after allergen inhalation in atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med.* 161:1553-8.
- Machleidt, T., W.P. Li, P. Liu, and R.G. Anderson. 2000. Multiple domains in caveolin-1 control its intracellular traffic. *J Cell Biol.* 148:17-28.
- Maldonado-Baez, L., and B. Wendland. 2006. Endocytic adaptors: recruiters, coordinators and regulators. *Trends Cell Biol.* 16:505-13.
- Manning, P.J., J. Rokach, J.L. Malo, D. Ethier, A. Cartier, Y. Girard, S. Charleson, and P.M. O'Byrne. 1990. Urinary leukotriene E4 levels during early and late asthmatic responses. *J Allergy Clin Immunol.* 86:211-20.
- Marinissen, M.J., and J.S. Gutkind. 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci.* 22:368-76.
- Marmor, M.D., and Y. Yarden. 2004. Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Oncogene.* 23:2057-70.
- Marom, Z., J.H. Shelhamer, M.K. Bach, D.R. Morton, and M. Kaliner. 1982. Slow-reacting substances, leukotrienes C4 and D4, increase the release of mucus from human airways in vitro. *Am Rev Respir Dis.* 126:449-51.
- Massoumi, R., C. Larsson, and A. Sjolander. 2002. Leukotriene D(4) induces stress-fibre formation in intestinal epithelial cells via activation of RhoA and PKCdelta. *J Cell Sci.* 115:3509-15.
- Mayor, F., Jr., P. Penela, and A. Ruiz-Gomez. 1998. Role of G protein-coupled receptor kinase 2 and arrestins in beta-adrenergic receptor internalization. *Trends Cardiovasc Med.* 8:234-40.

- McLauchlan, H., J. Newell, N. Morrice, A. Osborne, M. West, and E. Smythe. 1998. A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits. *Curr Biol.* 8:34-45.
- McNiven, M.A., H. Cao, K.R. Pitts, and Y. Yoon. 2000. The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem Sci.* 25:115-20.
- Meggio, F., and L.A. Pinna. 2003. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *Faseb J.* 17:349-68.
- Mellado, M., J.M. Rodriguez-Frade, A.J. Vila-Coro, S. Fernandez, A. Martin de Ana, D.R. Jones, J.L. Toran, and A.C. Martinez. 2001. Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *Embo J.* 20:2497-507.
- Mellor, E.A., N. Frank, D. Soler, M.R. Hodge, J.M. Lora, K.F. Austen, and J.A. Boyce. 2003. Expression of the type 2 receptor for cysteinyl leukotrienes (CysLT2R) by human mast cells: Functional distinction from CysLT1R. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:11589-93.
- Menard, L., S.S. Ferguson, J. Zhang, F.T. Lin, R.J. Lefkowitz, M.G. Caron, and L.S. Barak. 1997. Synergistic regulation of beta2-adrenergic receptor sequestration: intracellular complement of beta-adrenergic receptor kinase and beta-arrestin determine kinetics of internalization. *Mol Pharmacol.* 51:800-8.
- Merrifield, C.J., M.E. Feldman, L. Wan, and W. Almers. 2002. Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat Cell Biol.* 4:691-8.
- Metters, K.M., and R.J. Zamboni. 1993. Photoaffinity labeling of the leukotriene D4 receptor in guinea pig lung. *J Biol Chem.* 268:6487-95.
- Mita, H., Y. Yui, N. Taniguchi, H. Yasueda, and T. Shida. 1985. Increased activity of 5-lipoxygenase in polymorphonuclear leukocytes from asthmatic patients. *Life Sci.* 37:907-14.
- Mong, S., H.L. Wu, G.K. Hogaboom, M.A. Clark, and S.T. Crooke. 1984. Characterization of the leukotriene D4 receptor in guinea-pig lung. *Eur J Pharmacol.* 102:1-11.
- Monier, S., R.G. Parton, F. Vogel, J. Behlke, A. Henske, and T.V. Kurzchalia. 1995. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell.* 6:911-27.
- Morris, H.R., G.W. Taylor, P.J. Piper, P. Sirois, and J.R. Tippins. 1978. Slow-reacting substance of anaphylaxis: purification and characterisation. *FEBS Lett.* 87:203-6.

- Mousavi, S.A., L. Malerod, T. Berg, and R. Kjekshus. 2004. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J.* 377:1-16.
- Mundy, D.I., T. Machleidt, Y.S. Ying, R.G. Anderson, and G.S. Bloom. 2002. Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 115:4327-39.
- Murnane, J.P., M.J. Yezzi, and B.R. Young. 1990. Recombination events during integration of transfected DNA into normal human cells. *Nucleic Acids Res.* 18:2733-8.
- Murphy, R.C., S. Hammarstrom, and B. Samuelsson. 1979. Leukotriene C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:4275-9.
- Murray, J.W., and A.W. Wolkoff. 2003. Roles of the cytoskeleton and motor proteins in endocytic sorting. *Adv Drug Deliv Rev.* 55:1385-403.
- Musacchio, A., C.J. Smith, A.M. Roseman, S.C. Harrison, T. Kirchhausen, and B.M. Pearse. 1999. Functional organization of clathrin in coats: combining electron cryomicroscopy and X-ray crystallography. *Mol Cell.* 3:761-70.
- Naga Prasad, S.V., S.A. Laporte, D. Chamberlain, M.G. Caron, L. Barak, and H.A. Rockman. 2002. Phosphoinositide 3-kinase regulates beta2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/beta-arrestin complex. *J Cell Biol.* 158:563-75.
- Naik, S., C.K. Billington, R.M. Pascual, D.A. Deshpande, F.P. Stefano, T.A. Kohout, D.M. Eckman, J.L. Benovic, and R.B. Penn. 2005. Regulation of cysteinyl leukotriene type 1 receptor internalization and signaling. *J Biol Chem.* 280:8722-32.
- Nakamura, H., T. Hishinuma, N. Suzuki, S. Chiba, H. Tsukamoto, M. Takabatake, T. Sawai, T. Mitomo, H. Inoue, F. Matsumoto, and M. Mizugaki. 2001. Difference in urinary 11-dehydro TXB2 and LTE4 excretion in patients with rheumatoid arthritis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 65:301-6.
- Nasu, Y., T.L. Timme, G. Yang, C.H. Bangma, L. Li, C. Ren, S.H. Park, M. DeLeon, J. Wang, and T.C. Thompson. 1998. Suppression of caveolin expression induces androgen sensitivity in metastatic androgen-insensitive mouse prostate cancer cells. *Nat Med.* 4:1062-4.
- Nesterov, A., R.E. Carter, T. Sorkina, G.N. Gill, and A. Sorkin. 1999. Inhibition of the receptor-binding function of clathrin adaptor protein AP-2 by dominant-negative mutant mu2 subunit and its effects on endocytosis. *Embo J.* 18:2489-99.

- Nielsen, C.K., R. Massoumi, M. Sonnerlind, and A. Sjolander. 2005. Leukotriene D4 activates distinct G-proteins in intestinal epithelial cells to regulate stress fibre formation and to generate intracellular Ca²⁺ mobilisation and ERK1/2 activation. *Exp Cell Res.* 302:31-9.
- Nothacker, H.P., Z. Wang, Y. Zhu, R.K. Reinscheid, S.H. Lin, and O. Civelli. 2000. Molecular cloning and characterization of a second human cysteinyl leukotriene receptor: discovery of a subtype selective agonist. *Mol Pharmacol.* 58:1601-8.
- Novick, P., and M. Zerial. 1997. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol.* 9:496-504.
- Oakley, R.H., S.A. Laporte, J.A. Holt, L.S. Barak, and M.G. Caron. 1999. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem.* 274:32248-57.
- Oakley, R.H., S.A. Laporte, J.A. Holt, M.G. Caron, and L.S. Barak. 2000. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem.* 275:17201-10.
- Obata, T., T. Kobayashi, Y. Okada, N. Nakagawa, T. Terawaki, and H. Aishita. 1992. Effect of a peptide leukotriene antagonist, ONO-1078 on antigen-induced airway microvascular leakage in actively sensitized guinea pigs. *Life Sci.* 51:1577-83.
- Oh, P., D.P. McIntosh, and J.E. Schnitzer. 1998. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol.* 141:101-14.
- Ohno, H., J. Stewart, M.C. Fournier, H. Bosshart, I. Rhee, S. Miyatake, T. Saito, A. Gallusser, T. Kirchhausen, and J.S. Bonifacino. 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science.* 269:1872-5.
- Ohshima, N., H. Nagase, T. Koshino, M. Miyamasu, M. Yamaguchi, K. Hirai, K. Yamamoto, T. Fujisawa, N. Nakagawa, K. Kishikawa, and Y. Morita. 2002. A functional study on CysLT(1) receptors in human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol.* 129:67-75.
- Okamoto, T., A. Schlegel, P.E. Scherer, and M.P. Lisanti. 1998. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem.* 273:5419-22.
- Okamoto, Y., H. Ninomiya, S. Miwa, and T. Masaki. 2000. Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 275:6439-46.

- Opmeer, F.A., and H.C. Hoogsteden. 1984. Characterization of specific receptors for leukotriene D4 on human alveolar macrophages. *Prostaglandins*. 28:183-94.
- Oppermann, M., N.J. Freedman, R.W. Alexander, and R.J. Lefkowitz. 1996. Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. *J Biol Chem*. 271:13266-72.
- O'Sullivan, S., S.E. Dahlen, K. Larsson, B.M. Larsson, P. Malmberg, M. Kumlin, and L. Palmberg. 1998a. Exposure of healthy volunteers to swine house dust increases formation of leukotrienes, prostaglandin D2, and bronchial responsiveness to methacholine. *Thorax*. 53:1041-6.
- O'Sullivan, S., A. Roquet, B. Dahlen, S. Dahlen, and M. Kumlin. 1998b. Urinary excretion of inflammatory mediators during allergen-induced early and late phase asthmatic reactions. *Clin Exp Allergy*. 28:1332-9.
- Owen, D.J., and P.R. Evans. 1998. A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science*. 282:1327-32.
- Owen, D.J., Y. Vallis, M.E. Noble, J.B. Hunter, T.R. Dafforn, P.R. Evans, and H.T. McMahon. 1999. A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain. *Cell*. 97:805-15.
- Page, L.J., and M.S. Robinson. 1995. Targeting signals and subunit interactions in coated vesicle adaptor complexes. *J Cell Biol*. 131:619-30.
- Paing, M.M., A.B. Stutts, T.A. Kohout, R.J. Lefkowitz, and J. Trejo. 2002. beta - Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation. *J Biol Chem*. 277:1292-300.
- Paleotti, O., E. Macia, F. Luton, S. Klein, M. Partisani, P. Chardin, T. Kirchhausen, and M. Franco. 2005. The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. *J Biol Chem*. 280:21661-6.
- Pals-Rylaarsdam, R., V.V. Gurevich, K.B. Lee, J.A. Ptasienski, J.L. Benovic, and M.M. Hosey. 1997. Internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Arrestin-independent and -dependent pathways. *J Biol Chem*. 272:23682-9.
- Panettieri, R.A., E.M. Tan, V. Ciocca, M.A. Luttmann, T.B. Leonard, and D.W. Hay. 1998. Effects of LTD4 on human airway smooth muscle cell proliferation, matrix expression, and contraction In vitro: differential sensitivity to cysteinyl leukotriene receptor antagonists. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 19:453-61.
- Parent, J.L., P. Labrecque, M.J. Orsini, and J.L. Benovic. 1999. Internalization of the TXA2 receptor alpha and beta isoforms. Role of the differentially spliced cooh terminus in agonist-promoted receptor internalization. *J Biol Chem*. 274:8941-8.

- Parton, R.G., B. Joggerst, and K. Simons. 1994. Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol.* 127:1199-215.
- Paruchuri, S., and A. Sjolander. 2003. Leukotriene D4 mediates survival and proliferation via separate but parallel pathways in the human intestinal epithelial cell line Int 407. *J Biol Chem.* 278:45577-85.
- Patel, H.H., B.P. Head, H.N. Petersen, I.R. Niesman, D. Huang, G.J. Gross, P.A. Insel, and D.M. Roth. 2006. Protection of adult rat cardiac myocytes from ischemic cell death: role of caveolar microdomains and delta-opioid receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291:H344-50.
- Pavord, I.D., R. Ward, G. Woltmann, A.J. Wardlaw, J.R. Sheller, and R. Dworski. 1999. Induced sputum eicosanoid concentrations in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 160:1905-9.
- Pawson, A.J., S.R. Maudsley, J. Lopes, A.A. Katz, Y.M. Sun, J.S. Davidson, and R.P. Millar. 2003. Multiple determinants for rapid agonist-induced internalization of a nonmammalian gonadotropin-releasing hormone receptor: a putative palmitoylation site and threonine doublet within the carboxyl-terminal tail Are critical. *Endocrinology.* 144:3860-71.
- Pearson, R.B., and B.E. Kemp. 1991. Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol.* 200:62-81.
- Pelkmans, L., T. Burli, M. Zerial, and A. Helenius. 2004. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell.* 118:767-80.
- Pelkmans, L., D. Puntener, and A. Helenius. 2002. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science.* 296:535-9.
- Pendleton, A., B. Pope, A. Weeds, and A. Koffer. 2003. Latrunculin B or ATP depletion induces cofilin-dependent translocation of actin into nuclei of mast cells. *J Biol Chem.* 278:14394-400.
- Penela, P., C. Ribas, and F. Mayor, Jr. 2003. Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal.* 15:973-81.
- Penn, R.B., A.N. Pronin, and J.L. Benovic. 2000. Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends Cardiovasc Med.* 10:81-9.
- Perez, D.M., and S.S. Karnik. 2005. Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev.* 57:147-61.

- Perry, S.J., and R.J. Lefkowitz. 2002. Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation. *Trends Cell Biol.* 12:130-8.
- Peters, S.P. 2003. Leukotriene receptor antagonists in asthma therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 111:S62-70.
- Pippig, S., S. Andexinger, K. Daniel, M. Puzicha, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz, and M.J. Lohse. 1993. Overexpression of beta-arrestin and beta-adrenergic receptor kinase augment desensitization of beta 2-adrenergic receptors. *J Biol Chem.* 268:3201-8.
- Pippig, S., S. Andexinger, and M.J. Lohse. 1995. Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol Pharmacol.* 47:666-76.
- Pitcher, J.A., N.J. Freedman, and R.J. Lefkowitz. 1998. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem.* 67:653-92.
- Pitcher, J.A., E.S. Payne, C. Csontos, A.A. DePaoli-Roach, and R.J. Lefkowitz. 1995. The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:8343-7.
- Pollok-Kopp, B., K. Schwarze, V.K. Baradari, and M. Oppermann. 2003. Analysis of ligand-stimulated CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation in intact cells using phosphosite-specific antibodies. *J Biol Chem.* 278:2190-8.
- Pong, S.S., R.N. DeHaven, F.A. Kuehl, Jr., and R.W. Egan. 1983. Leukotriene C4 binding to rat lung membranes. *J Biol Chem.* 258:9616-9.
- Popova, J.S., and M.M. Rasenick. 2004. Clathrin-mediated endocytosis of m3 muscarinic receptors. Roles for Gbetagamma and tubulin. *J Biol Chem.* 279:30410-8.
- Puri, V., R. Watanabe, R.D. Singh, M. Dominguez, J.C. Brown, C.L. Wheatley, D.L. Marks, and R.E. Pagano. 2001. Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways. *J Cell Biol.* 154:535-47.
- Qualmann, B., M.M. Kessels, and R.B. Kelly. 2000. Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 150:F111-6.
- Rapacciuolo, A., S. Suvarna, L. Barki-Harrington, L.M. Luttrell, M. Cong, R.J. Lefkowitz, and H.A. Rockman. 2003. Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways. *J Biol Chem.* 278:35403-11.

- Raposo, G., I. Dunia, C. Delavier-Klutchko, S. Kaveri, A.D. Strosberg, and E.L. Benedetti. 1989. Internalization of beta-adrenergic receptor in A431 cells involves non-coated vesicles. *Eur J Cell Biol.* 50:340-52.
- Raposo, G., I. Dunia, S. Marullo, C. Andre, J.G. Guillet, A.D. Strosberg, E.L. Benedetti, and J. Hoebeke. 1987. Redistribution of muscarinic acetylcholine receptors on human fibroblasts induced by regulatory ligands. *Biol Cell.* 60:117-23.
- Razani, B., and M.P. Lisanti. 2001. Caveolins and caveolae: molecular and functional relationships. *Exp Cell Res.* 271:36-44.
- Razani, B., S.E. Woodman, and M.P. Lisanti. 2002. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev.* 54:431-67.
- Reiss, T.F., L.C. Altman, P. Chervinsky, A. Bewtra, W.E. Stricker, G.P. Noonan, S. Kundu, and J. Zhang. 1996. Effects of montelukast (MK-0476), a new potent cysteinyl leukotriene (LTD4) receptor antagonist, in patients with chronic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 98:528-34.
- Reungpatthanaphong, P., C. Marbeuf-Gueye, L. Le Moyec, M. Salerno, and A. Garnier-Suillerot. 2004. Decrease of P-glycoprotein activity in K562/ADR cells by MbetaCD and filipin and lack of effect induced by cholesterol oxidase indicate that this transporter is not located in rafts. *J Bioenerg Biomembr.* 36:533-43.
- Rodal, S.K., G. Skretting, O. Garred, F. Vilhardt, B. van Deurs, and K. Sandvig. 1999. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell.* 10:961-74.
- Roettger, B.F., R.U. Rentsch, D. Pinon, E. Holicky, E. Hadac, J.M. Larkin, and L.J. Miller. 1995. Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J Cell Biol.* 128:1029-41.
- Roseberry, A.G., and M.M. Hosey. 2001. Internalization of the M2 muscarinic acetylcholine receptor proceeds through an atypical pathway in HEK293 cells that is independent of clathrin and caveolae. *J Cell Sci.* 114:739-46.
- Rosenfeld, J.L., B.J. Knoll, and R.H. Moore. 2002. Regulation of G-protein-coupled receptor activity by rab GTPases. *Receptors Channels.* 8:87-97.
- Rothberg, K.G., J.E. Heuser, W.C. Donzell, Y.S. Ying, J.R. Glenney, and R.G. Anderson. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 68:673-82.
- Rothberg, K.G., Y.S. Ying, B.A. Kamen, and R.G. Anderson. 1990. Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J Cell Biol.* 111:2931-8.

- Sampson, A.P., D.P. Castling, C.P. Green, and J.F. Price. 1995. Persistent increase in plasma and urinary leukotrienes after acute asthma. *Arch Dis Child*. 73:221-5.
- Samuelsson, B. 1983. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*. 220:568-75.
- Samuelsson, B., S.E. Dahlen, J.A. Lindgren, C.A. Rouzer, and C.N. Serhan. 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*. 237:1171-6.
- Sarau, H.M., R.S. Ames, J. Chambers, C. Ellis, N. Elshourbagy, J.J. Foley, D.B. Schmidt, R.M. Muccitelli, O. Jenkins, P.R. Murdock, N.C. Herrity, W. Halsey, G. Sathe, A.I. Muir, P. Nuthulaganti, G.M. Dytko, P.T. Buckley, S. Wilson, D.J. Bergsma, and D.W. Hay. 1999. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharmacol*. 56:657-63.
- Sargiacomo, M., P.E. Scherer, Z. Tang, E. Kubler, K.S. Song, M.C. Sanders, and M.P. Lisanti. 1995. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:9407-11.
- Saussy, D.L., Jr., H.M. Sarau, J.J. Foley, S. Mong, and S.T. Crooke. 1989. Mechanisms of leukotriene E4 partial agonist activity at leukotriene D4 receptors in differentiated U-937 cells. *J Biol Chem*. 264:19845-55.
- Schlador, M.L., and N.M. Nathanson. 1997. Synergistic regulation of m2 muscarinic acetylcholine receptor desensitization and sequestration by G protein-coupled receptor kinase-2 and beta-arrestin-1. *J Biol Chem*. 272:18882-90.
- Schmid, S.L. 1997. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem*. 66:511-48.
- Schmid, S.L., M.A. McNiven, and P. De Camilli. 1998. Dynamin and its partners: a progress report. *Curr Opin Cell Biol*. 10:504-12.
- Schnitzer, J.E., P. Oh, E. Pinney, and J. Allard. 1994. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol*. 127:1217-32.
- Scott, M.G., A. Benmerah, and S. Marullo. 2004. [G protein coupled receptor endocytosis]. *Med Sci (Paris)*. 20:78-83.
- Seachrist, J.L., and S.S. Ferguson. 2003. Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sci*. 74:225-35.

- Shajahan, A.N., B.K. Timblin, R. Sandoval, C. Tiruppathi, A.B. Malik, and R.D. Minshall. 2004. Role of Src-induced dynamin-2 phosphorylation in caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells. *J Biol Chem.* 279:20392-400.
- Sharma, D.K., J.C. Brown, A. Choudhury, T.E. Peterson, E. Holicky, D.L. Marks, R. Simari, R.G. Parton, and R.E. Pagano. 2004. Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Mol Biol Cell.* 15:3114-22.
- Shenoy, S.K., P.H. McDonald, T.A. Kohout, and R.J. Lefkowitz. 2001. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science.* 294:1307-13.
- Shih, W., A. Gallusser, and T. Kirchhausen. 1995. A clathrin-binding site in the hinge of the beta 2 chain of mammalian AP-2 complexes. *J Biol Chem.* 270:31083-90.
- Shindo, K., K. Miyakawa, and M. Fukumura. 1993. Plasma levels of leukotriene B4 in asthmatic patients. *Int J Tissue React.* 15:181-4.
- Simmet, T., W. Luck, M. Winking, W.K. Delank, and B.A. Peskar. 1990. Identification and characterization of cysteinyl-leukotriene formation in tissue slices from human intracranial tumors: evidence for their biosynthesis under in vivo conditions. *J Neurochem.* 54:2091-9.
- Sjostrom, M., A.S. Johansson, O. Schroder, H. Qiu, J. Palmblad, and J.Z. Haeggstrom. 2003. Dominant expression of the CysLT2 receptor accounts for calcium signaling by cysteinyl leukotrienes in human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:e37-41.
- Smith, C.J., and B.M. Pearce. 1999. Clathrin: anatomy of a coat protein. *Trends Cell Biol.* 9:335-8.
- Smith, C.M., P.E. Christie, R.J. Hawksworth, F. Thien, and T.H. Lee. 1991. Urinary leukotriene E4 levels after allergen and exercise challenge in bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis.* 144:1411-3.
- Smith, C.M., R.J. Hawksworth, F.C. Thien, P.E. Christie, and T.H. Lee. 1992. Urinary leukotriene E4 in bronchial asthma. *Eur Respir J.* 5:693-9.
- Smith, W.L. 1992. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol.* 263:F181-91.
- Spada, C.S., A.L. Nieves, A.H. Krauss, and D.F. Woodward. 1994. Comparison of leukotriene B4 and D4 effects on human eosinophil and neutrophil motility in vitro. *J Leukoc Biol.* 55:183-91.

- Spector, S.L., L.J. Smith, and M. Glass. 1994. Effects of 6 weeks of therapy with oral doses of ICI 204,219, a leukotriene D4 receptor antagonist, in subjects with bronchial asthma. ACCOLATE Asthma Trialists Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 150:618-23.
- Sterne-Marr, R., and J.L. Benovic. 1995. Regulation of G protein-coupled receptors by receptor kinases and arrestins. *Vitam Horm.* 51:193-234.
- Syme, C.A., L. Zhang, and A. Bisello. 2006. Caveolin-1 regulates cellular trafficking and function of the glucagon-like Peptide 1 receptor. *Mol Endocrinol.* 20:3400-11.
- Tagari, P., P. Chee, C. Chan, K. McKee, C. Black, D. Nicholson, and A.W. Ford-Hutchinson. 1992. Quantitation of eosinophil Major Basic Protein cytotoxicity to rodent respiratory epithelium. *Agents Actions.* 37:171-3.
- Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki. 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 81:153-208.
- Takasaki, J., M. Kamohara, M. Matsumoto, T. Saito, T. Sugimoto, T. Ohishi, H. Ishii, T. Ota, T. Nishikawa, Y. Kawai, Y. Masuho, T. Isogai, Y. Suzuki, S. Sugano, and K. Furuichi. 2000. The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 274:316-22.
- Takei, K., V. Haucke, V. Slepnev, K. Farsad, M. Salazar, H. Chen, and P. De Camilli. 1998. Generation of coated intermediates of clathrin-mediated endocytosis on protein-free liposomes. *Cell.* 94:131-41.
- Tamaoki, J., M. Kondo, N. Sakai, J. Nakata, H. Takemura, A. Nagai, T. Takizawa, and K. Konno. 1997. Leukotriene antagonist prevents exacerbation of asthma during reduction of high-dose inhaled corticosteroid. The Tokyo Joshi-Idai Asthma Research Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 155:1235-40.
- Tang, E.A., D.G. Wiesch, and J.M. Samet. 2003. Epidemiology of asthma and allergic disease. *Allergy principles and practice.* 1:127-68.
- Tang, H., H. Shirai, and T. Inagami. 1995. Inhibition of protein kinase C prevents rapid desensitization of type 1B angiotensin II receptor. *Circ Res.* 77:239-48.
- Taylor, G.W., I. Taylor, P. Black, N.H. Maltby, N. Turner, R.W. Fuller, and C.T. Dollery. 1989. Urinary leukotriene E4 after antigen challenge and in acute asthma and allergic rhinitis. *Lancet.* 1:584-8.
- Thodeti, C.K., C.K. Nielsen, S. Paruchuri, C. Larsson, and A. Sjolander. 2001. The epsilon isoform of protein kinase C is involved in regulation of the LTD(4)-

- induced calcium signal in human intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res.* 262:95-103.
- Thompson, C., A. Cloutier, Y. Bosse, M. Thivierge, C.L. Gouill, P. Larivee, P.P. McDonald, J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2006. CysLT1 receptor engagement induces activator protein-1- and NF-kappaB-dependent IL-8 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 35:697-704.
- Thomson, N.C., and M. Shepherd. 2003. Leukotriene receptor antagonists as add-on therapy for adults with asthma. *Thorax.* 58:190-2.
- Tobin, A.B. 1997. Phosphorylation of phospholipase C-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 75:135-51.
- Tobin, A.B. 2002. Are we beta-ARKing up the wrong tree? Casein kinase 1 alpha provides an additional pathway for GPCR phosphorylation. *Trends Pharmacol Sci.* 23:337-43.
- Tobin, A.B., N.F. Totty, A.E. Sterlin, and S.R. Nahorski. 1997. Stimulus-dependent phosphorylation of G-protein-coupled receptors by casein kinase 1alpha. *J Biol Chem.* 272:20844-9.
- Traub, L.M., M.A. Downs, J.L. Westrich, and D.H. Fremont. 1999. Crystal structure of the alpha appendage of AP-2 reveals a recruitment platform for clathrin-coat assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:8907-12.
- Trejo, J., and S.R. Coughlin. 1999. The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling. *J Biol Chem.* 274:2216-24.
- Tudhope, S.R., N.J. Cuthbert, T.S. Abram, M.A. Jennings, R.J. Maxey, A.M. Thompson, P. Norman, and P.J. Gardiner. 1994. BAY u9773, a novel antagonist of cysteinyl-leukotrienes with activity against two receptor subtypes. *Eur J Pharmacol.* 264:317-23.
- Tulapurkar, M.E., R. Schafer, T. Hanck, R.V. Flores, G.A. Weisman, F.A. Gonzalez, and G. Reiser. 2005. Endocytosis mechanism of P2Y2 nucleotide receptor tagged with green fluorescent protein: clathrin and actin cytoskeleton dependence. *Cell Mol Life Sci.* 62:1388-99.
- Uittenbogaard, A., and E.J. Smart. 2000. Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J Biol Chem.* 275:25595-9.
- Underwood, D.C., R.R. Osborn, S.J. Newsholme, T.J. Torphy, and D.W. Hay. 1996. Persistent airway eosinophilia after leukotriene (LT) D4 administration in the

- guinea pig: modulation by the LTD4 receptor antagonist, pranlukast, or an interleukin-5 monoclonal antibody. *Am J Respir Crit Care Med.* 154:850-7.
- Vaughan, D.J., E.E. Millman, V. Godines, J. Friedman, T.M. Tran, W. Dai, B.J. Knoll, R.B. Clark, and R.H. Moore. 2006. Role of the G protein-coupled receptor kinase site serine cluster in beta2-adrenergic receptor internalization, desensitization, and beta-arrestin translocation. *J Biol Chem.* 281:7684-92.
- Vickery, R.G., and M. von Zastrow. 1999. Distinct dynamin-dependent and -independent mechanisms target structurally homologous dopamine receptors to different endocytic membranes. *J Cell Biol.* 144:31-43.
- Vila, J., J.M. Walker, E. Itarte, M.J. Weber, and J.J. Sando. 1989. Phosphorylation of protein kinase C by casein kinase-1. *FEBS Lett.* 255:205-8.
- Vogler, O., G.S. Bogatkewitsch, C. Wriske, P. Krummenerl, K.H. Jakobs, and C.J. van Koppen. 1998. Receptor subtype-specific regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration by dynamin. Distinct sequestration of m2 receptors. *J Biol Chem.* 273:12155-60.
- Volovyk, Z.M., M.J. Wolf, S.V. Prasad, and H.A. Rockman. 2006. Agonist-stimulated beta-adrenergic receptor internalization requires dynamic cytoskeletal actin turnover. *J Biol Chem.* 281:9773-80.
- Walsh, G.M. 2006. Targeting airway inflammation: novel therapies for the treatment of asthma. *Curr Med Chem.* 13:3105-11.
- Wang, L.H., T.C. Sudhof, and R.G. Anderson. 1995. The appendage domain of alpha-adaptin is a high affinity binding site for dynamin. *J Biol Chem.* 270:10079-83.
- Watterson, K.R., E. Johnston, C. Chalmers, A. Pronin, S.J. Cook, J.L. Benovic, and T.M. Palmer. 2002. Dual regulation of EDG1/S1P(1) receptor phosphorylation and internalization by protein kinase C and G-protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem.* 277:5767-77.
- Wenzel, S.E., G.L. Larsen, K. Johnston, N.F. Voelkel, and J.Y. Westcott. 1990. Elevated levels of leukotriene C4 in bronchoalveolar lavage fluid from atopic asthmatics after endobronchial allergen challenge. *Am Rev Respir Dis.* 142:112-9.
- Westcott, J.Y., K.M. Maxey, J. MacDonald, and S.E. Wenzel. 1998. Immunoaffinity resin for purification of urinary leukotriene E4. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 55:301-21.
- Whistler, J.L., J. Enquist, A. Marley, J. Fong, F. Gladher, P. Tsuruda, S.R. Murray, and M. Von Zastrow. 2002. Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science.* 297:615-20.

- Woszczek, G., R. Pawliczak, H.Y. Qi, S. Nagineni, S. Alsaaty, C. Logun, and J.H. Shelhamer. 2005. Functional characterization of human cysteinyl leukotriene 1 receptor gene structure. *J Immunol.* 175:5152-9.
- Wurm, F.M. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 22:1393-8.
- Yamaguchi, M., C.S. Lantz, H.C. Oettgen, I.M. Katona, T. Fleming, I. Miyajima, J.P. Kinet, and S.J. Galli. 1997. IgE enhances mouse mast cell Fc(epsilon)RI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J Exp Med.* 185:663-72.
- Yarar, D., C.M. Waterman-Storer, and S.L. Schmid. 2005. A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell.* 16:964-75.
- Yarrow, J. 1999. Courtesy Tomas Kirchhausen Collaboration Sheds Light on Assembly Of Cellular Transporter. *News from Harvard Medical, Dental and Public Health Schools.*
- Yuan, N., J. Friedman, B.S. Whaley, and R.B. Clark. 1994. cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C consensus site mutations of the beta-adrenergic receptor. Effect on desensitization and stimulation of adenylylcyclase. *J Biol Chem.* 269:23032-8.
- Zakrzewski, J.T., A.P. Sampson, J.M. Evans, N.C. Barnes, P.J. Piper, and J.F. Costello. 1989. The biotransformation in vitro of cysteinyl leukotrienes in blood of normal and asthmatic subjects. *Prostaglandins.* 37:425-44.
- Zhang, J., L.S. Barak, P.H. Anborgh, S.A. Laporte, M.G. Caron, and S.S. Ferguson. 1999. Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J Biol Chem.* 274:10999-1006.
- Zhang, J., S.S. Ferguson, L.S. Barak, L. Menard, and M.G. Caron. 1996a. Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem.* 271:18302-5.
- Zhang, M., D. Turnbaugh, D. Cofie, S. Dogan, H. Koshida, R. Fugate, and D.C. Kem. 1996b. Protein kinase C modulation of cardiomyocyte angiotensin II and vasopressin receptor desensitization. *Hypertension.* 27:269-75.
- Zhu, Y., M.T. Drake, and S. Kornfeld. 1999. ADP-ribosylation factor 1 dependent clathrin-coat assembly on synthetic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5013-8.